



Jäädytyksen vaikutus autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:ssa

Anna Virtanen

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2020

Kliininen asiantuntija (YAMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Kliininen asiantuntija (YAMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

VIRTANEN, ANNA:

Jäädytyksen vaikutus autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:ssa

Opinnäytetyö 64 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Toukokuu 2020

Autologisia kantasoluhoidoja käytetään pahanlaatuisten veritautien ja syöpäkasvainten tukihoidona suuriannoksisen solunsalpaajalääkityksen jälkeen. Lääkityksen seurauksena luuydin vaurioituu, mutta potilaalta etukäteen kerättyjen kantasolujen avulla luuytimen toiminta voidaan palauttaa. Sairaalan keräysyksikön ja kantasolulaboratorion tehtävänä on kerätä ja prosessoida hematopoieettiset kantasolut. Edellytyksenä on, että potilaalle myöhemmin palautettavat solut ovat elinkykyisiä ja turvallisia käyttää. Kantasolusiirtojen onnistumisen kannalta on myös tärkeää tietää, kuinka paljon kantasoluja tarvitaan onnistuneeseen hoitoon.

Kantasolut jäädytetään ja säilytetään nestetypessä siihen asti, kunnes ne palautetaan potilaalle. Jäädytys vaikuttaa kantasolujen määrään alentavasti. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia jäädytyksen vaikutusta autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa. Vaikutusta tutkittiin CD34+ solujen määrän, kantasoluviljelyiden ja viabiliteetti värjäyksen avulla. Tutkimukseen otettiin 15 autologista kantasolusiirrettä, jotka oli kerätty perifeerisestä verestä afereesikeräyslaitteen avulla. Tutkimus tehtiin yhteistyössä Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratorion kanssa. Tavoitteena oli selvittää kantasolujen jäädytys vaikuttaa niiden määrään juuri kyseisessä laboratoriossa verrattuna kansainvälisiin tutkimuksiin.

CD34+ solujen määrä laski kaikissa näytteissä. Parhaiten säilyneessä näytteessä kantasolujen määrä laski vain 5,2% ja huonoiten säilyneessä näytteessä kantasolujen määrä laski 76,7%. Keskimäärin kaikissa näytteissä (n=15) kantasolujen määrä laski 42%. Kantasoluviljelyiden vastaukset puolestaan olivat vaihtelevia ja jopa 40%:ssa kantasoluviljelyn tulos kasvoi. Viabiliteetti värjäyksessä tulokset olivat kaiken kaikkiaan hyviä ja kaikkien näytteiden keskiarvo oli 86%.

Tämä on ensimmäinen Fimlab Laboratoriot Oy:ssa tehty kooste jäädytyksen vaikutuksesta kantasoluihin ja siten tutkimuksena erittäin tärkeä juuri kyseiselle laboratoriolle. Jatkotutkimus aiheena voisi tehdä tutkimusta kantasolujen jäädytysprosessista. Voisi kokeilla erilaista jäädytys menetelmää esimerkiksi solujen laittamista ensin -80°C ja niiden jäätymistä siellä yön yli ennen nestetyppeen laittoa.

Asiasanat: autologinen kantasolusiirto, CD34+ kantasolut, hematologia, hematopoieettinen kantasolu, jäädytys

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Masters' Degree Programme in Clinical Expertise and Development

VIRTANEN, ANNA:

Effects of freezing on the autologous stem cells in Fimlab Laboratories Ltd.

Master's thesis 64 pages, appendices 3 pages
May 2020

Autologous stem cell transplantations are used as supportive care for cancers after high-dose chemotherapy. Medication damages the bone marrow, but with the help of stem cells bone marrow function can be restored.

Stem cells are stored in liquid nitrogen. The purpose of this thesis was to study the effect of freezing on autologous stem cells in Fimlab Laboratories Ltd. The effect was studied by CD34+ cell count, stem cell cultures and viability staining. Fifteen autologous stem cell transplants were included in this study. The aim was to find out and get concrete information how much the freezing of stem cells affects their number in that laboratory.

The results showed that the number of CD34+ cells decreased in all samples. On average, the stem cells in all samples decreased by 42%. The responses of stem cell cultures varied and in as many as 40% the result of stem cell culture increased. For viability staining, the results were good and the mean of all samples was 86%.

This was the first research made at Fimlab Laboratories Ltd about this topic and results were important. Further research on the subject could be research into the stem cell freezing process.

Key words: autologous stem cell, CD34 positive stem cell, hematology, hematopoietic stem cell, freezing

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	8
2	HEMATOPOIEESI	10
2.1	Verisolujen muodostuminen	10
2.2	Kantasolujen kypsyminen pääpiirteittäin	11
2.3	Kantasolujen elinympäristö	12
2.4	CD34+ solun ominaisuuksia.....	13
3	AUTOLOGISET KANTASOLUSIIRROT	15
3.1	Indikaatiot.....	15
3.2	Autologiset kantasolusiirrot hoitomenetelmänä	16
3.3	Kantasolujen keräys.....	17
3.4	Kantasolupalautus.....	19
4	KANTASOLUJEN TUTKIMINEN	22
4.1	Bakteeriviljelyt	22
4.2	Solulaskenta Sysmex XN-1000 tm verenkuvautomaatilla	23
4.3	CD34+ solujen virtaussytometrinen analyysi.....	24
4.4	Kantasoluviljely	27
4.5	Viabiliteetti.....	29
5	KANTASOLUJEN KÄSITTELY	31
5.1	Kantasolujen jäädytys	31
5.2	Kantasolujen säilytys.....	33
6	TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	35
7	TUTKIMUSMENETELMÄT	36
7.1	Tutkimusaineisto	36
7.2	Kantasolujen virtaussytometrinen määrittäminen	38
7.3	Kantasoluviljely	39
7.4	Viabiliteetti.....	40
7.5	Aineiston analysointi	41
8	TULOKSET	42
8.1	CD34+ solujen määrät	42
8.2	Kantasoluviljelyt tutkimuksessa.....	44
8.3	Viabiliteetti.....	46
9	POHDINTA	47
9.1	Tulosten tarkastelu.....	48
9.2	Luotettavuus	49
9.3	Eettisyys.....	51
10	JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUSAIHEET	54

LÄHTEET	56
LIITTEET	62
Liite 1. Kantasolukeräyksen koontilomake	62
Liite 2. Virtausytometrian esimerkkituloste	63
Liite 3. Autologinen kantasolusiirto vaiheittain	64

LYHENTEET JA TERMIT

7-AAD	7-aminoaktinomysiini D
Afereesi	menetelmä, jossa kokoverestä erotellaan koneellisesti halutut veren osat ja muut veren osat palautetaan luovuttajan verenkiertoon
APC	allofykosyaniini fluorokromi
BFU	burst forming unit, pesäkkeitä muodostavia suuntautuneita kantasoluja
BFU-E	erytrosyyttipesäke
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming unit, pesäkkeitä muodostavia suuntautuneita kantasoluja
CFU-GM	granulosyytti/makrofagi- pesäke
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
CRF	kontrolloidun nopeuden jäädytys
DMSO	dimetyylisulfioksidi
EPO	Erytropoietiini
FITC	fluoroisotiosyanaatti fluorokoromi
FSC	Forward Scatter, eteenpäin hajoavan valon sironta
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor granulosyyttikasvutekijät
Hematopoieesi	verisolujen syntyminen
Intensiivihoido	suuriannoksinen solunsalpaajahoito
ISHAGE	The International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
Kemokiinit	Joukko sytokiineja, jotka vastaavat solujen liikkumisen ohjaamisesta
Methocult GF	Methylcellulose medium with recombinant cytokines
MNC	Mononuclear Cell
Mobilisaatio	Kantasolujen irrotus luuytimeistä

Pansytopenia	Kaikkien solulinjojen (RBC, WBC ja tromposyytit) alhainen määrä
PBS	Phosphate-Buffered Saline, fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PE	fykoerytriini fluorokromi
PerCP	peridiniini-klorofylli-a-proteiini fluorokromi
SFL	Side Fluorescence light fluoresenssivalo
SSC	Side Scatter sivusirona
Sytokiini	Proteiinirakenteinen välittäjäaine, joka vastaa solujen välisestä viestinnästä
TNC	Total Nucleated Cell

1 JOHDANTO

Pahanlaatuisia veritauteja ja syöpäkasvaimia voidaan hoitaa suuriannoksilla solunsalpaajahoidoilla eli intensiivihoidolla. Niiden haittavaikutuksena potilaan luuydin lamaantuu, mutta sen toiminta voidaan korjata CD34+ kantasolujen avulla. CD-luokitus on kansainvälinen järjestelmä solujen pintamolekyyleille, jossa antigeenit ja samaa antigeenia tunnistavat vasta-aineet on nimetty CD-numerolla. (Hatton, Hay, Hughes-Jones & Keeling 2017, 104.) Luuydin toipuisi mahdollisesti ilmankin kantasolusiirtoa, mutta sen avulla toipumista voidaan nopeuttaa merkittävästi. Autologinen kantasolusiirto toimii siis tukihoitona suuriannoksisen solunsalpaajahoidon jälkeen, koska potilaalle palautetut kantasolut osaavat hakeutua takaisin luuytimeen ja elvyttää sen toiminnan. (Golubeva ym. 2014, 39; Hatton ym. 2017, 104; Porkka 2004, 1393.)

CD34+ kantasoluja voidaan kerätä luuytimestä, perifeerisestä verestä ja napaverestä (Hoffbrand & Moss 2011, 298). Verestä kerättyjen kantasolujen käytön etuna luuytimestä kerättyyn siirteeseen nähden on veren solujen nopeampi elpyminen intensiivihoidon jälkeen (Jantunen, Kuittinen, Mahlamäki & Nousiainen 2001, 1151). Nykyisin jopa 99% siirteistä kerätään perifeerisestä verestä (Passweg ym. 2014, 788). Kantasolusiirrot voivat olla syngeneisiä, allogeenisia tai autologisia. Syngeeninen kantasolusiirto tarkoittaa, että solut kerätään identtiseltä kaksoselta ja allogeenisissä siirroissa kantasolut ovat peräisin toiselta henkilöltä. Autologisissa kantasolusiirroissa siirteenä käytetään potilaan omia kantasoluja, jotka on aiemmin kerätty potilaalta itseltään. (Hatton ym. 2017, 104; Hoffbrand & Moss 2011, 298; Ruutu 2007, 492.)

Hematopoeettisten kantasolujen siirtoihin liittyvät menetelmät ovat kansainvälisten standardien säätelemiä, joista vastaa esimerkiksi kansainvälinen akkreditointi organisaatio JACIE (Joint Accreditation Committee of International Society of Cellular Therapy and European Society for Bone Marrow Transplantation). Sen tavoitteena on parantaa kantasolusiirtotoiminnan laatua ja turvallisuutta. (Morgenstern ym. 2016, 942.)

Tampereen yliopistollisen sairaalan kantasolujen keräysyksikkö ja Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratorio noudattavat toiminnassaan Euroopan unionin direktiivejä 2004/23/EY, 2006/17/EY ja 2006/86/EY sekä niiden pohjalta säädettyä lakia ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (547/2007). Lisäksi tulee noudattaa Valtioneuvoston asetuksia ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (773/2007), Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksia ihmisen kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (1302/2007) sekä Fimean määräyksiä Kudoslaitosten toimintaa koskevien teknisten vaatimusten (3/2007) osalta. (Luiro 2016.)

Keräysyksikön ja kantasolulaboratorion tehtävänä on kerätä ja prosessoida hematopoeettiset kantasolut. Kaikki perifeerisestä verestä kerätyt kantasolut käsitellään ja säilytetään kantasolulaboratoriossa. Edellytyksenä on, että potilaalle myöhemmin palautettavat solut ovat elinkykyisiä ja turvallisia käyttää. (Luiro 2016.) Tämä opinnäytetyö tehdään Fimlab Laboratoriot Oy:lle, joka on Suomen suurin terveydenhuollon laboratorioalan yritys ja tuottaa laboratoriopalveluja julkisen terveydenhuollon tarpeisiin. (Fimlab Laboratoriot Oy 2018.)

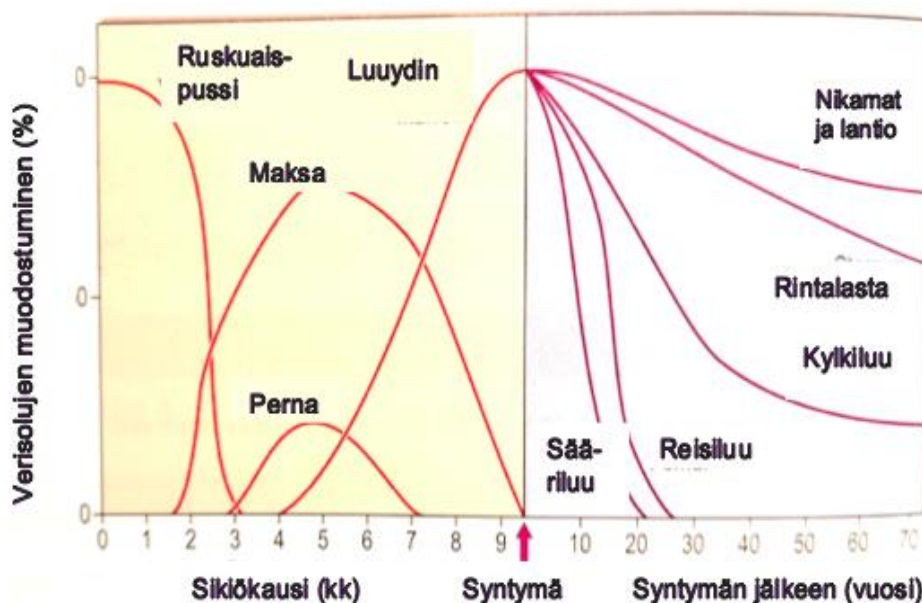
Kantasolusiirron onnistumisen yksi tärkeimmistä tekijöistä on CD34+ solujen määrä. Riittämätön CD34+ solujen määrä voi heikentää siirteen vaikutusta ja on siten kliinisesti merkitsevää. (Berens ym. 2016, 1326.) Tämän vuoksi on tärkeää tiedostaa, miten paljon jäädytys vaikuttaa CD34+ -solujen määrään.

Kantasoluja on kylmäsäilytetty nestetyypen eri lämpötiloissa jo yli 20 vuoden ajan (Detry ym. 2014, 780). On tiedossa, että kantasolujen jäädytys vaikuttaa CD34+ solujen määrään alentavasti, mutta kaiken kaikkiaan solut sietävät kohtuullisen hyvin jäädytystä (Berens ym. 2016, 1325; Donmez ym. 2014, 190; Detry ym. 2014, 785). Berens ym. (2016) ovat tutkineet erilaisten CD-solujen käyttäytymistä ja ovat havainneet, että CD34+ solut elpyvät sulatuksen jälkeen melko hyvin, koska niillä on erityisiä soluspesifisiä ominaisuuksia. Tässä tutkimuksessa tavoitteena oli selvittää kantasolujen jäädytys vaikuttaa niiden määrään juuri kyseisessä laboratoriossa verrattuna kansainvälisiin tutkimuksiin. Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia jäädytyksen vaikutusta autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa. Jäädytyksen vaikutusta tutkitaan CD34+ solujen määrän, soluviljelyiden kasvun ja solujen viabiliteetin avulla.

2 HEMATOPOIEESI

2.1 Verisolujen muodostuminen

Hematopoieesi on monivaiheinen tapahtumasarja, jossa tapahtuu solunjakautumista, erilaistumista ja kypsymistä. Verisolujen muodostuminen alkaa jo kolmannella raskausviikolla sikiön ruskuaispussissa, istukassa ja aortan seinämissä. Toisesta seitsemänteen raskausviikkoon muodostumista tapahtuu maksassa sekä pernassa ja kymmenennellä viikolla luuytimessä. Vähän ennen syntymää verisoluja muodostuu myös pernassa ja imusolmukkeissa (Howard & Hamilton, 2013, 2; Siitonen & Koistinen 2015, 16; Vilpo 2010, 15.) Syntymän jälkeen hematopoieettiset kantasolut muodostuvat luuytimessä ja niistä kehittyvät kaikki veren solut (Porkka 2004, 1391). Verisolujen muodostuminen eri ikäkausina on esitetty kuviossa 1.



KUVIO 1. Verisolujen muodostuminen sikiökaudella ja syntymän jälkeen (Howard & Hamilton 2013, muokattu)

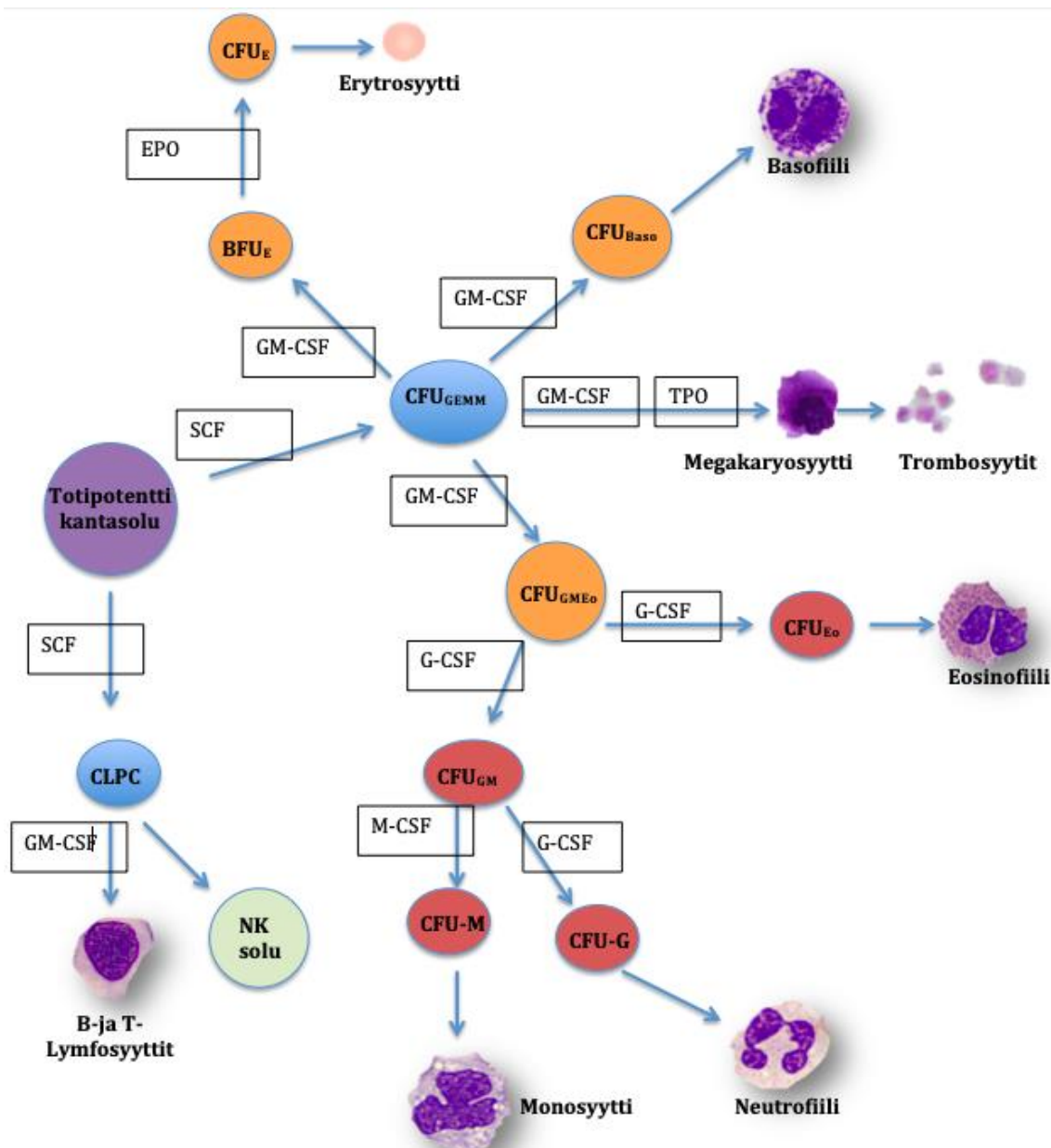
Vitamiineilla, hormoneilla ja erilaisilla hivenaineilla on suuri vaikutus verisolujen muodostumiseen. Keskeisessä asemassa verisolujen tuotannossa ovat myös hematopoieettiset kasvutekijät. Ne ovat glykoproteiineja tai polypeptideja, jotka kuuluvat sytokiineihin. Eri solulinjoilla on erilaiset kasvutekijät. Muutamia niistä

osataan valmistaa myös lääkkeiksi, kuten erytropoietiinia eli EPO:a ja granulocyte-kasvutekijää eli G-CSF:ää. Kasvutekijät paitsi edistävät solujen lisääntymistä, ne myös stimuloivat solujen erilaistumista ja kypsymistä, vaikuttavat kypsien solujen toimintaan sekä vähentävät solukuolemia. (Hoffbrand & Moss 2012, 6; Vilpo 2010, 17.)

2.2 Kantasolujen kypsyminen pääpiirteittäin

Yksittäinen kantasolu voi jakautua jopa yli 50 kertaa. Hematopoieettisen kantasolun kasvun ja erilaistumisen keskeisiä säätelytekijöitä ovat transkriptiotekijät, jotka vastaavat geenien aktivoitumisesta. (Siitonen & Koistinen 2015, 19.) Varhaisinta kantasolua, joka kykenee tuottamaan kaikkia verisolulinjoja, kutsutaan totipotentiksi kantasoluksi. Siitä muodostuu edelleen suuntautuneita kantasoluja, jotka pystyvät erilaistumaan vain tietyiksi verisoluiksi. Sen lisäksi, että totipotentista kantasolusta muodostuu kaikkia verisoluja, se pystyy myös tuottamaan itsensä kaltaisia soluja. (Hoffbrand & Moss 2011, 2; Vilpo 2010, 15-17)

Totipotentin kantasolun tarkkaa fenotyyppiä ei ole koskaan pystytty tarkoin määrittämään. Immunologisissa testeissä on todettu, että totipotentti kantasolu ilmentää ainakin CD34+, CD38- ja Lin- antigeenit. Lisäksi se muistuttaa melko paljon pientä lymfosyyttiä. Kuviossa 2 on esitetty hematopoieesi pääpiirteittäin ja sen eri vaiheisiin liittyvät kasvutekijät. Solun kypsyessä sen kromatiini tiivistyy, nukleolit häviävät ja sytoplasma kypsyä kunkin solutyypin morfologian mukaisesti. (Hoffbrand & Moss 2011, 2; Vilpo 2010, 15-17.)



KUVIO 2. Totipotentista kantasolusta erilaistuvat solulinjat ja vaikuttavat kasvutekijät eri vaiheissa (Hoffbrand & Moss 2012, muokattu)

2.3 Kantasolujen elinympäristö

Homeostaasin eli elimistön sisäisen tasapainon aikana suurin osa kantasoluista sijaitsee luuytimen spesifisessä mikroympäristössä, jota kutsutaan kantasolujen ekologiseksi lokeroksi "nicheksi". Nämä mikroympäristöt pitävät kantasolut lepo-tilassa (osteoblastinen niche) sen itsensä uudistamiseksi ja aktivoivat kantasolut

(verisuonten niche) proliferaation ja vaurioiden korjaamiseksi pitäen yllä dynaamisen tasapainon itsensä uudistumisen ja erilaistumisen välillä. (Suárez-Álvarez, López-Vázquez & López-Larrea 2012, 157.)

Luuydin on paras mahdollinen elinympäristö kantasoluille. Se koostuu stroomasoluista, joita ovat: osteoblastit, fibroblastit, rasvasolut, hermosolut, makrofagit, CAR-solut, jotka sisältävät kalsiumia tunnistavan reseptorin sekä sinusoidien ja kapillaarien endoteelisolut. Lisäksi luuytimessä on stroomasolujen tuottamaa soluväliainetta sekä verisuonia. (Howard & Hamilton 2013, 2; Siitonen & Koistinen 2015, 20.)

Soluväliaine koostuu kasvutekijöistä, fibronektiinistä, trombospondiinista, proteo- ja glykosaminoglykaaneista sekä lisäksi kollageenin lujittamasta laminiiniverkostosta. Nämä kaikki ovat mukana kantasolujen kasvussa sekä elossa pysymisessä. Kantasolut ovat tarttuneena tähän soluväliaineeseen ja stroomasoluihin CXCR4-, integriini-, sialomusiini- sekä selektiinireseptoreillaan. Joukossa on myös immunoglobuliinia muistuttavia reseptoreita ja CD44:ää. Kantasolut sijaitsevat yleensä lähellä solun pintaa, osteoblasteihin kiinnittyneinä. (Siitonen & Koistinen 2015, 20.) Osteoblastit erittävät kantasoluja sääteleviä tekijöitä, kuten angiopoietiinia (ANG-1), trombopoietiinia (THPO) ja CXC-kemokiiniligandi 12:ta (CXCL12), jota kutsutaan myös SDF-1:ksi. (Suárez-Álvarez ym. 2012, 155.)

2.4 CD34+ solun ominaisuuksia

Hematopoieettisten kantasolujen rakenne on samantyyppinen kuin lymfosyytillä. Solujen pinnalla on niille ominaisia antigeenirakenteita, jotka vaihtuvat solujen kypsyessä. Antigeenejä vastaan voidaan tehdä monoklonaalisia vasta-aineita. CD34+ molekyyli on kantasolun pintamarkkeri, jota käytetään laajasti hematopoieettisten kantasolujen tunnistamiseen ja eristämiseen. Yleisimmin CD34+ solut tunnistetaan ja määritetään virtausytometrian avulla, koska se on nopea ja hyvin toistettava menetelmä. (Howard & Hamilton 2013, 21; Rico ym. 2018, 172; Preti ym. 2014, 1558, Vilpo 2010, 17.) Kaikista luuytimen soluista noin 1-3 prosenttia on CD34 antigeeni positiivisia (Siitonen & Koistinen 2015, 19).

CD34+ solun pinta-antigeeni on glykoproteiini, joka kuuluu solupinnan transmembraanisten proteiinien CD34-perheeseen ja sisältää podokalyksiiniä ja endoglykaania. Sitä esiintyy kaikkien lymfohemopoieettisen järjestelmän linjojen kantasoluissa, mutta ei kypsissä soluissa. CD34 on voimakkaasti glykosyloitunut monomeerinen soluadheesiomolekyyli, joka sisältää runsaasti O-sitoutuneita hiilihydraatteja ja siaalihappoa. Pinta-antigeenin toimintaa ei tunneta kovinkaan perusteellisesti ja sille onkin esitetty monia erilaisia tehtäviä, kuten proliferaation eli solujen uudistumisen lisääminen sekä progenitorisolujen erilaistumisen estäminen. Lisäksi se osallistuu hematopoieettisten solujen migraatioon ja liikkumiseen. (El-Ghariani & Szczepiorkowski 2017, 446; Knight 2010, 276; Varmavuo 2013, 8.)

3 AUTOLOGISET KANTASOLUSIIRROT

3.1 Indikaatiot

Autologinen kantasolusiirto toimii tukihoitona intensiivihoidon jälkeen. Monissa taudeissa, kuten multippeli myeloomassa, sillä ei pystytä parantamaan tautia, mutta sillä saadaan lisää elinaikaa. Poikkeuksena on kuitenkin jotkut lymfoomatyypit, joista pystytään parantamaan jopa puolet potilaista. Autologinen kantasolusiirto vaiheittain on esitetty liitteessä 3. (Itälä-Remes & Volin 2015, 466.)

Autologiseen kantasolusiirtoon tulevan potilaan on oltava peruskunniltaan riittävän hyvä ja maksimissaan 65-70-vuotias. Autologisen kantasolusiirron tärkeimmät ja yleisimmät aiheet aikuisilla ovat Non-Hodgkinin ja Hodgkinin lymfoomat (B- ja T-solulymfoomat, manttelisolulymfooma, burkittin lymfooma ja follikulaarinen lymfooma) sekä multippelit myeloomat ja lapsilla pahanlaatuiset kasvaimet, kuten neuroblastoomat ja sarkoomat. (Itälä-Remes & Volin 2015, 468; Mian, Foley & O'Hoski 2017, 455.) Vuonna 2014 Euroopassa tehtiin kantasolusiirtoja 36 469 potilaalle, joista autologisia siirtoja oli 20 704 (57%). Siirtoja tehtiin tuolloin 47 maassa ja 656 sairaalassa. Vuonna 2014 Euroopassa yleisimmät indikaatiot siirroille olivat: myelooma (50,3%), Non Hodgkinin lymfooma (29,3%) ja Hodgkinin lymfooma (9,8%). (Passweg ym. 2016, 787.) Vuonna 2019 Tampereen yliopistollisessa sairaalassa autologisia siirtoja tehtiin 46 potilaalle. Taulukossa 1 on esitetty autologiset kantasolusiirrot diagnoosin mukaan vuonna 2019. (Pirkanmaan sairaanhoitopiirin kuntayhtymä 2020.)

TAULUKKO 1. Tehdyt autologiset kantasolusiirrot diagnoosin mukaan Tampereen yliopistollisessa sairaalassa vuonna 2019.

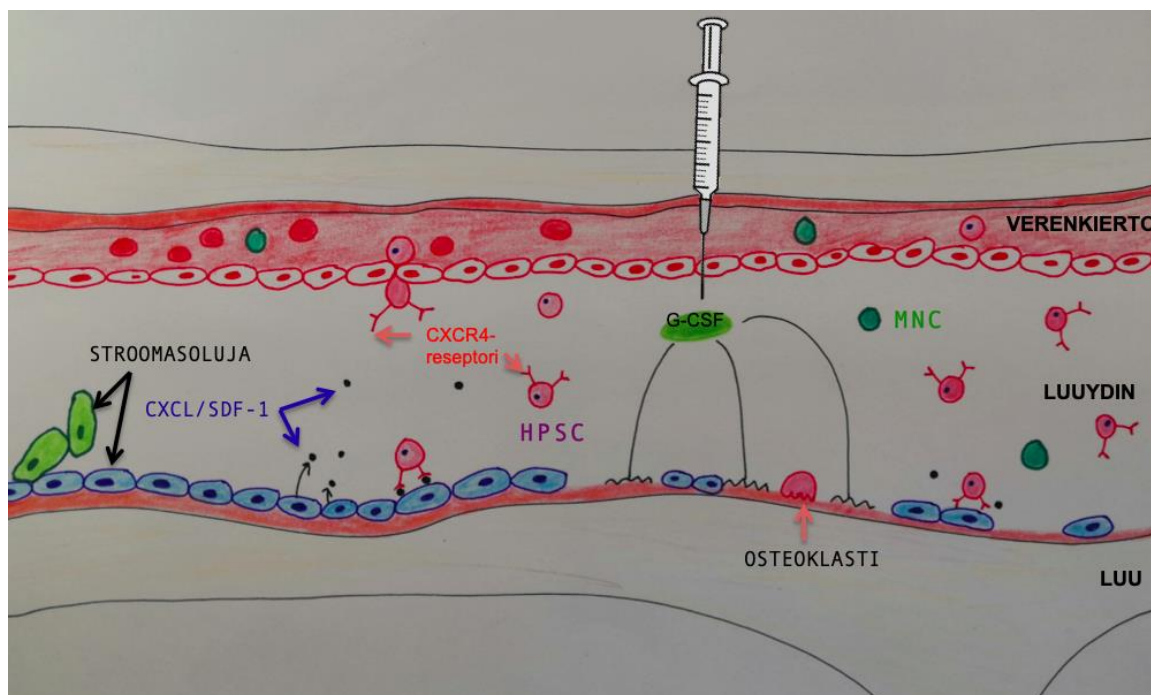
Diagnoosi	Määrä
Diffuusi suurisoluinen B-solulymfooma	7
Manttelisolulymfooma	3
Perifeerinen T-solulymfooma	1
Follikulaarinen lymfooma	2
Myelooma	32
Plexus choroideuksen karsinooma	1

3.2 Autologiset kantasolusiirrot hoitomenetelmänä

Kantasolujen siirtymistä luuytimeistä verenkiertoon kutsutaan mobilisaatioksi. Normaalisti verenkierrossa on vain 0,1 prosenttia kantasoluja. (El-Ghariani & Szczepiorkowski 2017, 443; Vilpo 2010, 17.) Luonnollisesti kantasoluja voi siirtyä luuytimeen esimerkiksi kudolvauriotilanteissa, mutta kantasoluja voidaan myös mobilisoida verenkiertoon erilaisten lääkkeiden avulla. Monilla sytokiineillä on tärkeä rooli hematopoiesissa. Kun kantasoluja altistetaan sytokiineille ne alkavat lisääntyä ja kypsyä. Yksi tärkeä sytokiini on granulosityttikasvutekijä G-CSF. Antamalla potilaille kasvutekijää (G-CSF), voidaan kantasolujen määrää verenkierrossa nostaa jopa 1,5 prosenttiin. Potilaalle voi tulla mobilisaatiohoidon aikana luv- ja lihaskipuja sekä päänsärkyä. (Babic & Trigoso, 2017, luku 5.2.2; McCollough 2017, 135, 480; Siitonen & Koistinen 2015, 20.)

Mobilisaatio ja homing (ks. kappale kantasolujen palautus) ovat prosesseja, jotka riippuvat kemokiinien, kemokiinireseptorien, solunsisäisen signaloinnin, adheesiomoduulien ja proteaasien välisestä vuorovaikutuksesta. Adheesiomolekyylien SDF-1/ CXCL12: n ja sen reseptorin CXCR4:n välinen vuorovaikutus on kriittistä kantasolujen pitämiseksi luuytimessä. CXCR4 reseptori niin sanotusti ankkuroi kantasoluja luuydinmatriisiin. (Babic & Trigoso, 2017, luku 5.2.2; Suárez-Álvarez ym. 2012, 152.)

Kasvutekijä stimuloi neutrofiileja tuottamaan elastaasia, joka puolestaan pilkkoo kanta- ja stroomasolujen välisen CXCR4/SDF-1 sidoksen, jolloin kantasolut pääsevät vapautumaan verenkiertoon (kuva 1). Kasvutekijän antamisen jälkeen CD34+ solujen määrä alkaa lisääntyä verenkierrossa suunnilleen kolmen päivän kuluttua, saavuttaa huippunsa 5-6 päivän kuluttua ja noin kahdeksantena päivänä niiden määrä alkaa taas laskea, vaikka kasvutekijän antamista lisättäisiin. Jos pelkällä kasvutekijällä ei saada mobilisoitua riittävästi kantasoluja, voidaan apuna käyttää pleriksafori-nimistä lääkettä. Se salpaa kantasolujen CXCR4 reseptoreita ja estää niiden vuorovaikutusta SDF-1:n kanssa, jolloin kantasolut pääsevät vapautumaan verenkiertoon tehokkaammin. Sopiva määrä kantasoluja yhteen siirtoon on $2,5-5 \times 10^6/\text{kg}$. (El-Ghariani & Szczepiorkowski 2017, 444-446; McCollough 2017, 135, 480; Siitonen & Koistinen 2015, 20.)



KUVA 1. Kantasolujen mobilisaatio luuytimeä verenkiertoon (Virtanen 2020)

3.3 Kantasolujen keräys

Autologiset kantasolut kerätään perifeerisestä verestä mobilisaatiohoidon avulla (Rounioja 2016, 1). Potilaan kantasolujen keräysajankohta sovitaan viikoittain pidettävissä kantasolukokouksissa. Ennen keräystä potilas on saanut muutamia kertoja solunsalpaajahoitoja, jotta keräysvaiheessa olisi mahdollisimman vähän tautia aiheuttavia soluja. Solunsalpaajaa ei saa kuitenkaan antaa liikaa, koska ne voivat myös vaikuttaa keräystuotteen laatuun. Ajankohdan lähestyessä seurataan päivittäin potilaan leukosyyttiarvoja. Kun veren leukosyyttitulos on aikuisilla yli $1,0 \times 10^9/l$ ja lapsilla yli $0,8 \times 10^9/l$, tehdään samasta näytteestä CD34- määrittäminen. (El-Ghariani & Szczepiorkowski 2017, 446; Rontu 2018, 2.)

Jotta tiedetään, milloin soluja on mobilisoitunut luuytimeä perifeeriseen vereen riittävästi, mitataan niiden määrä verestä virtausytometrisesti käyttäen spesifistä fluorokromilla leimattua vasta-ainetta. CD34-määrittämisessä lasketaan CD34+ kantasolujen absoluuttinen määrä. Kun CD34+ solujen määrä veressä on vähintään $20 \times 10^6/l$, aloitetaan keräys. (El-Ghariani & Szczepiorkowski 2017, 446;

Rontu 2018, 2.) Kantasolut kerätään potilaan perifeerisestä verestä soluerottelilaitteen eli afereesilaitteen avulla. Myös kantasolukeräyksen jälkeen mitataan kantasolujen määrä afereesituotteesta.

Afereesi tehdään puoliautomaatteilla (kuva 2), joita kutsutaan verisoluerottimiksi tai solujen erottelijakoneeksi. Afereesilaitteita on kahta eri tyyppiä, toinen toimii jatkuvan virtauksen periaatteella ja toinen ajoittaisen virtauksen periaatteella. Tampereen yliopistollisessa sairaalassa on käytössä jatkuvan virtauksen menetelmä ja optinen havainnointitekniikka. Keräyshoitaja syöttää potilaan pituuden, painon, sukupuolen, hematokriitin sekä leukosyyttien ja trombosyyttien määrän laitteeseen. Järjestelmä käyttää tietoja kokoverimäärän laskemiseen. Keräyslaitteen järjestelmään kuuluu tietty määrä kertymis- ja keräysvaiheita, joiden määrä riippuu potilaan leukosyyttien määrästä. (CaridianBCT 2011, 24; Itälä-Remes & Volin 2015, 471; McCollough 2017, 123.)

Kertymisvaiheessa luovuttajan kokoveri johdetaan laitteen läpi 2-3 kertaa, jossa se sentrifugoidaan ja veri erotetaan punasoluiksi, plasmaksi, valkosoluiksi ja verihiutaleiksi. Haluttu komponentti erotellaan gravitaation sekä väridetektion avulla ja johdetaan laitteen kammioon. Loppuosa verestä yhdistetään uudelleen ja palautetaan luovuttajalle. Keräysvaihe alkaa, kun kammio on täynnä haluttuja soluja. Keräyspumppu pysähtyy, sentrifugin nopeus hidastuu ja keräysventtiili avautuu, jolloin kammio tyhjentyy keräyspussiin. Kantasolujen keräys kestää tavallisesti noin 4-5 tuntia. (CaridianBCT 2011, 20; Itälä-Remes & Volin 2015, 471; McCollough 2017, 123.)



KUVA 2. Terumo Spectra Optia afereesikeräyslaite. (Terumo BCT 2019)

Laitteen mikroprosessori ohjaa antikoagulantin lisäämistä ja erotusprosessia. Koska soluerottelu riippuu keskipakoisvoimasta ja viipymisajasta gravitaatiokentässä, mikroprosessori muuttaa sentrifugin nopeutta, jos veren virtausnopeus vaihtelee. Keräyshoitaja voi kuitenkin mukauttaa kantasolujen keräystä halutessaan tarkkailemalla punasolujen ja buffy-kerroksen välistä rajapintaa. Koko keräyksen aikana keräyshoitajan pitää tarkkailla rajapintaa ja keräysmateriaalin väriä afereesituotteen optimoimiseksi. (McCollough 2017, 136.)

Tampereen yliopistollisessa sairaalassa keräysyksikkö ilmoittaa, kun keräys on valmis. Laboratoriohoitaja hakee afereesin osastolta ja ottaa siitä tarvittavat näytteet mikrobiologialle ja virtaussytometrialle. Näytteistä on kerrottu tarkemmin kappaleessa neljä. Kantasoluja kerätään $3,0 \times 10^6/\text{kg}$ CD34-solua jokaista siirtoa kohden. Jos ei saada kerättyä tavoiteltua määrää, voi hoitava lääkäri päättää potilaskohtaisesti riittääkö pienempi määrä. (Siro 2019.) Ehdoton minimi solumäärä, mitä palautetaan potilaalle, on kuitenkin $2,0 \times 10^6/\text{kg}$ (Itälä-Remes & Volin 2015, 471).

3.4 Kantasolupalautus

Kantasolujen palautusajankohta riippuu potilaan taudista. Ennen siirtoa potilas saa myeloablatiivisen tai lähes myeloablatiivisen esihoidon. Myeloablatiivinen hoito hävittää tai vaurioittaa luuytimen toiminnan. Myeloomissa se on suuriannoksinen melfalaani ja lymfoomissa monisolusalpaajayhdistelmä, jossa voi olla karbimastiinia (BCNU), etoposidia, sytarabiinia ja melfalaania tai syklofosfamidia. (Itälä-Remes & Volin 2015, 473.) Yhdessä palautuksessa CD34+ soluja pitää olla vähintään $3,0 \times 10^6/\text{kg}$ (Siro 2019). Kantasolut kuljetetaan osastolle niille tarkoitettussa kylmäkuljetussäiliössä, cryoshipperissä (kuva 3). Säiliö on aiemmin täytetty nestetypellä, joka on imeytynyt säiliön reunoille. Solut ovat näin kuljetuksen ajan nestetypen kaasufaasissa. (Walters 2013, 229.)



KUVA 3. Kantasolujen palautuskärry, vesihaude ja cryoshipper kylmäkuljetussäiliö (Virtanen 2020)

Palautettaviin soluihin on lisätty solujen suoja-ainetta, dimetyylisulfioksidia eli DMSO:ta. Kantasolujen käsittely on esitetty tarkemmin kappaleessa viisi. DMSO on soluille myrkyllistä huoneenlämmössä, joten palautus täytyy tehdä sulattamalla yksi valmistepussi kerrallaan vesihauteessa. DMSO:ta ei siis pestä pois soluista, vaikka se voi aiheuttaa potilaalle haittavaikutuksena esimerkiksi pahoinvointia, oksentelua, allergisia reaktioita sekä sydän- ja hengitysongelmia. Sen vuoksi on huomioitava, että potilas saa DMSO:ta enintään 1g/kg päivässä. Vesihauteen lämpötilan pitää olla 35-39°C ja solut on sulatettava mahdollisimman nopeasti, eivätkä ne saa lämmetä ollenkaan. Liian nopea sulaminen voi aiheuttaa soluissa kiteytymistä. Liian kuuma lämpötila puolestaan voi vahingoittaa solujen elinkykyä ja valkuaisaineet voivat paakkuuntua. (Raval, McKay & Park 2017, 60; Mian ym. 2017, 463.) Fimlab Laboratoriot Oy:ssa on sulatukseen käytössä vesihauteet, joiden lämpötila on 39°C (Siro 2018).

DMSO:n lisäksi haittavaikutuksia voivat aiheuttaa myös sulatuksesta johtuva solujen aggregaatio ja kuolleiden solujen kappaleet, nukleaariset solut, solususpension tilavuus ja sen matala lämpötila, elektrolyyttinen epätasapaino ja punasolujen hajoaminen, jolloin hemoglobiinia, elektrolyyttejä ja membraanifragmentteja vapautuu. Lisäksi potilaskohtaiset tekijät, kuten ikä, paino, sukupuoli, infuusioaika tai tietty sairaus, voivat vaikuttaa haitallisten infuusioreaktioiden kehittymiseen. Monet tekijät voivat siis aiheuttaa potilaalle reaktioita, eikä ole täysin varmaa,

mikä on suurin syy haittavaikutuksien aiheuttajille. (Shu, Heimfeld & Gao 2014, 473.)

Ennen infuusiota potilaalle annetaan esilääkityksenä muun muassa pahoinvointilääkettä, antihistamiinia, diureettia ja kortisonia. Pitkäaikainen altistuminen DMSO:lle voi vaikuttaa suoraan solun toimintaan ja kasvuun vaikuttamalla aineenvaihduntaan, entsyymaattiseen aktiivisuuteen, solusykliin ja apoptoosiin. Lyhytaikainen altistuminen ja kylmät lämpötilat kuitenkin minimoivat mahdolliset haitalliset vaikutukset. (Shu ym. 2014, 475.) Sulatus kestää noin viisi minuuttia valmistepussin koosta riippuen (Walters 2013, 230). Valmiste on palautettava potilaaseen viidentoista minuutin kuluessa sulatuksesta, jotta minimoidaan aika, jolloin solut altistuvat DMSO:lle huoneenlämmössä (Siro 2018).

Palautuksen aikana potilas on kytkettynä monitoriin ja hoitaja seuraa verenpainetta, ruumiinlämpöä, sykettä sekä potilaan yleistä vointia. Kun kantasoluja siirretään takaisin verenkiertoon infuusion avulla, ne osaavat palata takaisin luuytimeen muutamissa tunneissa. Tätä kutsutaan homing-ilmiöksi. Luuytimeen päästyään kantasolut käynnistävät hematopoieesin luuytimessä. Ensimmäiset merkit siirteen tarttumisesta pitkän pansytopenia jakson jälkeen, alkavat näkyä noin 10-14 päivän kuluttua siirrosta, kun neutrofiilejä ja monosyyttejä ilmestyy verenkiertoon. (Siitonen & Koistinen 2015, 20; Walters 2013, 231.)

Autologinen kantasolusiirto on helpompi ja turvallisempi kuin allogeeninen kantasolusiirto. Kantasolusiirre ei itsessään aiheuta ongelmia esimerkiksi ABO- tai HLA-sopivuuden kanssa, koska solut ovat potilaan omia. (Raval ym. 2017, 59.) Potilas joutuu yleensä olemaan sairaalassa kolmesta neljään viikkoon, jonka aikana voi ilmetä pahoinvointia, ripulia, suun ja suoliston limakalvovaurioita. Potilas saa intensiivihoidon jälkeen puoli vuotta infektiolääkitystä. Jos kaikki sujuu hyvin, oikeastaan muuta lääkitystä ei tarvita. (Itälä-Remes & Volin 2015, 472.)

4 KANTASOLUJEN TUTKIMINEN

Valmiin keräystuotteen käsittely tehdään kantasolulaboratoriossa. Infektoriskin välttämiseksi kantasolujen keräämistä, käsittelyä, säilyttämistä ja sulattamista seurataan tarkasti. (Abbuzzese ym. 2010, 172.) Jotta voidaan varmistua afereesin laadusta ja turvallisuudesta, pitää siitä tehdä bakteeriviljely, solulaskenta Sysmex XN-1000tm– verenkuvautomaatilla sekä CD34-määritys Beckman Coulter Naviostm- virtausytometrillä (kuva 4). Solulaskennasta katsotaan leukosyyttien määrä, jota hyödynnetään virtausytometrillä CD34-määritykseen ja totaalisolumäärän laskemiseen. (Raval ym. 2017, 59; Siro 2019.)



KUVA 4. Beckman Coulter Naviostm – virtausytometri (Beckman Coulter Life Sciences 2017)

4.1 Bakteeriviljelyt

Steriiliyden testaaminen, joka soveltuu afereesin kliinisesti merkittävien bakteerien ja sieniperäisen kontaminaation havaitsemiseksi, on tehtävä vähintään afereesin käsittelyn loppuvaiheessa. On kuitenkin suositeltavaa, että bakteeriviljelynäytteet otetaan afereesista ensimmäisenä ennen muita näytteitä ja lisäksi jokaisen käsittelyvaiheen jälkeen. Näytemäärä pitää kuitenkin minimoida mahdollisimman pieneksi, jotta afereesituotetta jää mahdollisimman paljon potilasta varten. Bakteeriviljelynäyte pitäisi ottaa myös jokaisesta solupussista niiden palautuksen yhteydessä. (Mian ym. 2017, 259.) Tavallisimmin bakteeriviljelynäytteitä otetaan aina kaksi: solujen käsittelyn yhteydessä ennen ja jälkeen jäädytysliuoksen lisäämistä (Raval ym. 2017, 59).

Bakteeriviljelyn tuloksen pitää olla negatiivinen. Sillä varmistetaan, että aseptinen työskentely on toteutunut ja kantasolusiirre on turvallinen siirtää potilaalle. Hoidoissa olevien potilaiden immuunipuolustus on heikentynyt ja kontaminoituneen kantasolusiirteen palauttaminen potilaalle lisää sairastumisen riskiä. Yleisin kontaminaation aiheuttaja on jokin ihon normaalifloorassa olevista bakteereista eikä vakavia seurauksia siirteistä juurikaan ole havaittu. (Namdaroğlu ym. 2013, 405.)

4.2 Solulaskenta Sysmex XN-1000tm verenkuva-automaatilla

Sysmex XN-1000tm (kuva 5) on automatisoitu hematologian analysaattori. Se toimii fluoresenssivirtausytometrian periaatteella ja käyttää puolijohdelaseria antamaan kolmen tyypistä optista tietoa soluista. Eteenpäin hajottava valo (Forward Scatter, FSC), joka osoittaa solun koon, sivuhajonta (Side Scatter, SSC) määrittelee sisäisen rakenteen, kuten rakeiden, monimutkaisuuden, ja sivu fluoresenssivalo (Side Fluorescence light, SFL) ilmaisee ytimen pitoisuuden. (Sunilkumar & Preeta 2016, 658-660.)

Näyte imetään analysaattoriin ja veri jaetaan alikvaatteihin eli erotellaan pieniin annoksiin eri kanavia varten. Se laimennetaan ennalta asetettuun suhteeseen ja merkitään patentoidulla fluoresenssimarkkerilla, joka sitoutuu spesifisesti nukleiinihappoihin. Näyte kuljetetaan virtauskennoon. Näyte valaistetaan puolijohdelaserilla, joka erottaa solut kolmella eri signaalilla: SSC, FSC ja SFL. Solut, joilla on samanlaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, muodostavat niin sanotun pilven kaavioon, jota kutsutaan hajontakuvioksi. (Sysmex 2020.)



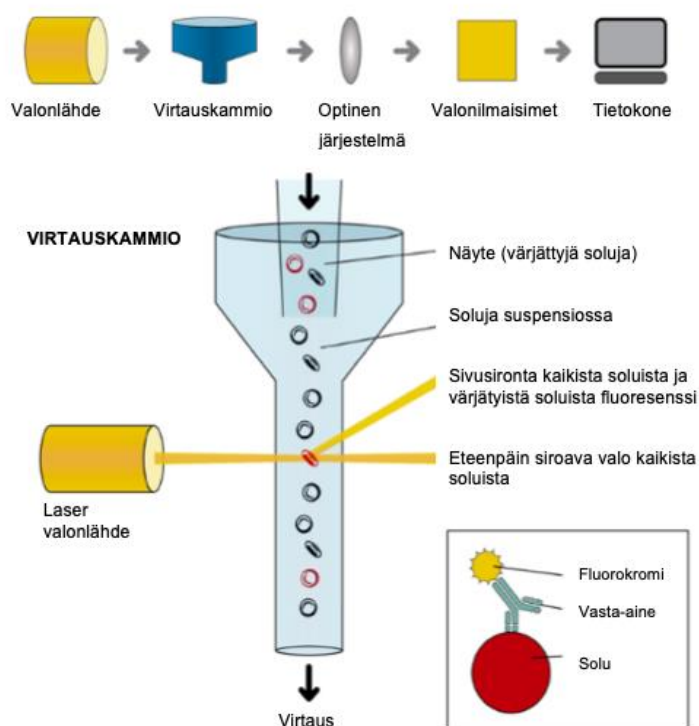
KUVA 5. Sysmex XN-1000tm (Sysmex 2020)

Solulaskennan vastauksessa ei ole viitearvoja, vaan vastausta tarvitaan CD34+ solujen virtausytometriseen määrittelyyn. Verenkuvautomaatin leukosyyttimäärää käytetään laadunvarmistukseen vertaamalla sitä Beckman Coulter Naviostm-virtausytometrin analyysistä saatuun leukosyyttimäärään. Näin leukosyyttimäärä, jota käytetään CD34-määrittelyyn, on varmistettu oikeaksi kahdella eri laitteella. Jos jotain syystä Beckman Coulter Naviostm – virtausytometri ei pystyisi määrittämään näytteen leukosyyttiarvoja tai antaisi väärän tuloksen, käytettäisiin määrittelyssä verenkuvautomaatin leukosyytti vastausta. (Uusirasi 2020.)

4.3 CD34+ solujen virtausytometrinen analyysi

CD34+ kantasolujen virtausytometrinen analyysi otettiin ensimmäisen kerran käyttöön 1990-luvun alkupuolella, ja vuosien mittaan se on vakiinnuttanut asemansa kliinisissä laboratorioissa (Varmavuo 2013, 10). Yhden alustan ISHA- GE-menetelmä on laajimmin hyväksytty menetelmä CD34+ solujen laskemiseen. Tämä menetelmä noudattaa viimeisimpiä suosituksia erilaisille monoklonaalisille vasta-aineklooneille ja fluoresoiville konjugaateille tai erilaisille elinkykyisille väriaineille kuolleiden solujen käytännön sulkemiseksi pois. (Rico ym. 2018, 172.)

Virtaussytometriassa laite rekisteröi lasersäteen läpi kulkevien partikkeleiden siroamaa valoa. Solususpensiossa olevat partikkelit kohdistetaan paineistetun vaippanesteen avulla yksitellen lasersäteeseen. Kun lasersäde kohtaa solun tahtahtuu valonsirontaa. Näytteestä mitataan eteenpäin kohdistuva valonsironta ja sivusironta. Eteenpäin siroava valo on verrannollinen partikkelin kokoon ja sivusironta partikkelin granulaarisuuteen. Mitä suurempi eteenpäin siroava valo on, sitä suurempi myös solu on. Monimutkaisien, voimakkaasti granulaaristen solujen sivusironta on puolestaan suurempi, kuin yksinkertaisten solujen. Kuvassa 6 on esitetty virtaussytometrin komponentit. (Siitonen & Penttilä 2015, 139.)



KUVA 6. Virtaussytometrin komponentit (Lab Test Online 2020, muokattu)

Suoran ja sivusironnan lisäksi solupopulaatioiden ja solun pinnan antigeenirakenteiden tunnistamiseen käytetään fluorokromeja eli fluoresoivia merkkiaineita, jotka kiinnitetään solun rakenteita tunnistaviin monoklonaalisiin vasta-aineisiin CD34: ää vastaan, jotka puolestaan kiinnittyvät solun antigeeneihin. Yleisimmin käytettyjä fluorokromeja ovat FITC, PE, PerCP ja APC. Kantasoluille on tyypillistä, että ne ekspressoivat CD34-antigeeniä ja ilmentävät matalaa sivusirontaa. (Haein ym. 2019, 388; Rico ym. 2018, 172-173; Varmavuo 2013, 9- 10.)

Ensimmäisissä virtausytometrian analyyseissä CD34+ solujen laskemiselle käytettiin epäsuoraa immunofluoresensstekniikkaa ja punasolujen hajotusmenetelmiä sentrifugointi- ja pesuvaiheilla. CD34+ solujen määrät saatiin alun perin käyttämällä kaksialustaista tekniikkaa, joka tunnetaan myös nimellä Milan-protokolla. Kaksialustaisen menetelmän käyttö tarkoitti, että automatisoidulla verenkuvanalysaattorilla mitattiin kerättyjen leukosyyttien kokonaismäärä ja CD34+ kantasolujen osuus kaikista leukosyyteistä määritetään virtausytometrillä. (Rico ym. 2018, 172; Varmavuo 2013, 10.)

Nykyiset virtausytometriapohjaiset menetelmät ihmisen hematopoieettisten kantasolujen laskemiseen sisältävät niin sanotun yhden alustan strategian, absoluuttiset laskentahelmet, elinkelpoisuusvärin 7-AAD:n, lyysauspesuliuoksen ja laserin aallonpituudeltaan 480 nanometriä. Tämä menetelmä perustuu joko tilavuusmittauksiin tai tunnetun laskentahelmien pitoisuuden käyttöön näytteessä. Yhden alustan ISHAGE -menetelmässä käytetään fluoresoivia mikrohelmiä tunnetussa konsentraatiossa. Havaitulla suhteella virtausytometrisesti laskettujen helmien lukumäärän ja CD34+ solujen välillä voidaan laskea absoluuttinen CD34+ solumäärä. (Avecilla ym. 2018, 1; Murugesan ym. 2019, 42; Rico ym. 2018, 172; Sutherland ym. 2009, 596; Varmavuo 2013, 10.)

Fimlab Laboratoriot Oy:ssa CD34+ kantasolujen määrä mitataan virtausytometrisesti käyttäen spesifistä fluorokromilla leimattua vasta-ainetta. Fimlab Laboratoriot Oy:ssa käytössä oleva virtausytometri on esitetty kuvassa 6. Menetelmässä käytetään Stem-Kit[™] reagensseja. Ne on suunniteltu tunnistamaan hematopoieettiset kantasolut tietyillä kriteereillä: kantasolut ekspressoivat CD34- ja CD45-antigeeniä heikosti sekä ilmentävät matalaa sivusirontaa ja matalasta keskimääräiseen eteenpäin siroavaa valoa. (Rounioja 2016,1.)

Näytteenä voi olla EDTA-putkeen otettu perifeerinen veri tai afereesituote. Näytteen leukosyyttipitoisuus saa olla enintään 30. Sen ollessa yli 30, täytyy näyte laimentaa ennen määrittystä, koska käytettävät vasta-ainemäärät ovat niin pieniä, että korkeammilla leukosyyttipitoisuuksilla ne eivät enää riittäisi sitoutumaan suureen solumäärään. (Uusirasi 2020.) Näyte leimataan CD45-FITC / CD34-PE vasta-aineilla. Lisäksi afereesinäytteisiin lisätään 7-AAD viabiliteettiväri. Näytteitä

pipetoidaan aina kahteen putkeen rinnakkaisia määrittämiä varten ja lisäksi pipetoidaan yksi kontrolliputki. Vasta-aineiden lisäämisen jälkeen näytettä inkuboidaan 20 minuuttia valolta suojattuna, lisätään 10 x NH₄CL lyysausliuosta ja inkuboidaan vielä 10 minuuttia. Lopuksi lisätään helmet ja mitataan näyte virtausytometrillä. Liitteessä 2 on virtausytometrin esimerkki tuloste. (Rounioja 2016, 5.) Tulosten saamiseksi virtausytometriin on liitetty tietojenkäsittelyjärjestelmä, jolla tuloksia voidaan muokata sirontakuvioiksi ja histogrammeiksi (Siitonen & Penttilä 2015, 139).

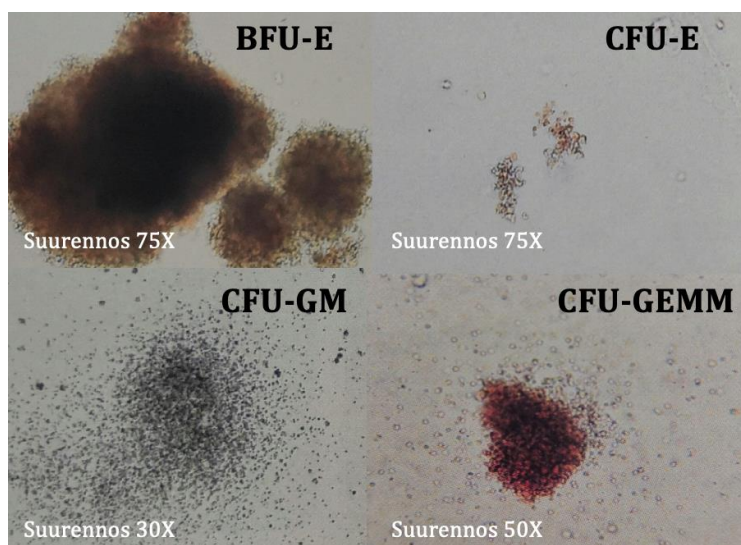
4.4 Kantasoluviljely

Kantasoluviljelyllä varmistetaan solujen elinkyky ja kyky jakaantua ennen solujen palautusta potilaalle kantasolukeräyksen ja solujen jäädytyksen jälkeen. Viljelymaljoista tutkitaan pesäkkeitä, joiden perusteella pystytään päättelemään kantasolun tyyppi. (Howard & Hamilton 2013, 2.) Hematopoeettiset kantasolut muodostavat erytrosyyttipesäkkeitä ja granulositytti- tai granulositytti/makrofagi-pesäkkeitä puolikiinteässä metyyliiselluloosamediumissa, kun niitä stimuloidaan erilaisilla kasvutekijöillä. (Mian ym. 2017, 458.) Fimlab Laboratoriot Oy:ssä viljelyyn käytetään Stemcell Technologiesin MethoCult™ metyyliiselluloosareagenssia (Siro 2017a).

Soluja viljellään 14 vuorokautta hiilidioksidikaapissa (+37°C, 5% CO₂, 90% ilman kosteus), jonka jälkeen soluviljelymaljoissa kasvavat pesäkkeet lasketaan mikroskoopilla (Siro 2017a). Kantasolu on pesäkkeen muodostava yksikkö (CFU) ja niitä muodostavia kantasoluja nimitetään pesäketypin mukaan.

CFU-E (colony-forming unit-erythroid) pesäkkeessä on pieniä ja nopeasti kypsyviä punasoluja. Kypsät CFU-E pesäkkeet koostuvat vain yhdestä tai kahdesta pienestä rykelmästä soluja, jotka sisältävät enintään 100-200 erytroblastia. Soluissa on hieman hemoglobiinia ja väriltään ne ovat punertavan oransseja. BFU-E (burst-forming unit-erythroid) pesäke on alkeellisempi kuin CFU-E. BFU-E pesäkkeellä on kuitenkin suurempi leviämiskyky, joka mahdollistaa sen kasvun suuremmaksi. Pesäkkeet koostuvat kolmesta pienestä tai yhdestä isosta pesäkkeestä, joissa on yli 200 erytroblastia. (Stem Cell Technologies 2011, 6-9.)

Valkosolujen kantasolupesäkkeet määritellään niiden pesäkkeiden muodostamiskyvyn mukaan. Yleensä valkosolupesäkkeessä on 20-50 solua. Suurin osa valkosolujen kantasolupesäkkeistä on kantasoluja, jotka ovat rajoittuneita erilaistumaan granulosyyteiksi ja/tai makrofageiksi. Valkosolupesäkkeitä on kolme tyyppiä: CFU-M pesäkkeessä makrofageja, CFU-G pesäkkeessä granulosyyttejä ja CFU-GM pesäkkeessä granulosyyttejä sekä makrofageja. Valkosolujen kantasolupesäkkeet ovat kooltaan suurempia kuin erytroisen linjan kantasolupesäkkeet. Ne eivät sisällä hemoglobiinia, joten mikroskoopissa ne erottuvat vaaleina, hieman kellertävinä tai harmaina soluina. Kantasoluviljelyssä voidaan erottaa myös niin sanottu yhdistelmä pesäke, CFU-GEMM. Pesäkkeessä on granulosyyttejä, erytrosyyttejä, makrofageja sekä megakaryosyyttejä. (StemCell Technologies 2011, 17: Vilpo 2010, 16-17.) Erilaiset puna- ja valkosolujen kantasolupesäkkeet on esitetty kuvassa 7.



KUVA 7. BFU-E, CFU-E, CFU-GM ja CFU-GEMM pesäkkeet mikroskoopissa katsottuna kahden viikon kasvatuksen jälkeen. (Stem Cell Technologies 2011, muokattu)

Rutiinisti potilasnäytteistä lasketaan granulosyytti-makrofagipesäkkeet sekä punasolupesäkkeet. Fimlab Laboratoriot Oy:ssa granulosyytti-makrofagipesäkkeessä pitää olla vähintään 40 solua ja punasolupesäkkeessä vähintään 300 solua tai 3 pientä pesäkettä hyvin lähellä toisiaan. Afereesituotteesta vastataan CFU-GM pesäkkeiden määrä potilaan painokiloa kohden, joka lasketaan tietyllä

kaavalla, riippuen onko näytteessä ollut CD34+ soluja alle vai yli prosentti. Kantasolukeräyksessä ja -siirrossa viljelyn viitearvo on yli 10×10^4 CFU-GM pesäkettä potilaan painokiloa kohden. (Siro 2017a.)

CD34+ soluja alle 1%:

$$X = \frac{CFU - GM \text{ Pesäkemäärä} \times \text{Kokonaissolumäärä} (TNC \times 10^6) \times 10^4}{10}$$

Lopuksi jaetaan potilaan painolla

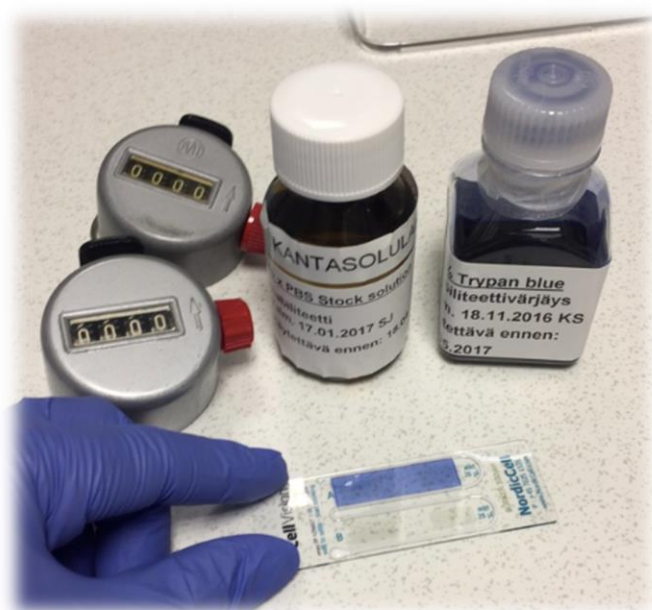
CD34+ soluja yli 1%:

$$X = \frac{CFU - GM \text{ Pesäkemäärä} \times TNC \times 10^4}{1}$$

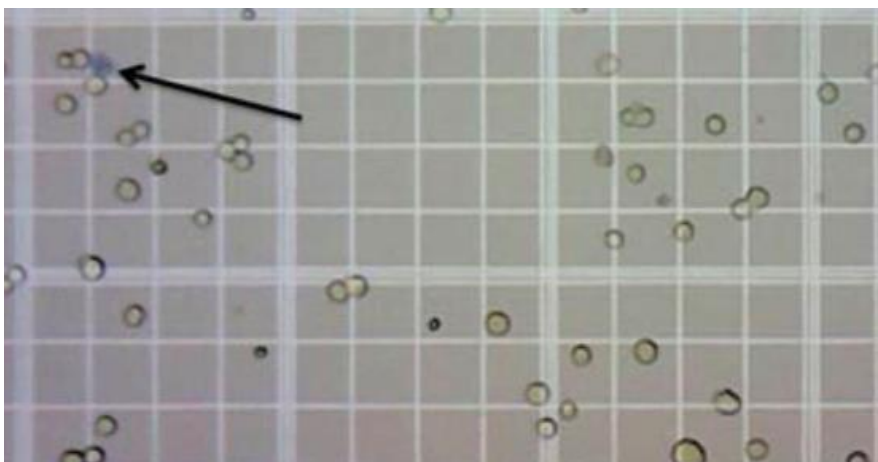
Lopuksi jaetaan potilaan painolla

4.5 Viabiliteetti

Kantasolujen elinkykyisyyttä voidaan tutkia myös viabiliteetti-värjäyksellä (Mian, Foley, O'Hoski 2017, 458). Fimlab Laboratoriot Oy:ssa viabiliteetti lasketaan aina yön yli säilytetystä kantasolukeräystuotteesta sekä kantasolupalautuksen jälkeen palautetuista solupusseista otetusta näytteestä (Siro 2017c). Sen avulla tarkastellaan elävien kantasolujen määrää näytteissä. Solujen määrä lasketaan Bürkerin kammiossa käyttämällä Trypan blue-värjäystä (kuva 8-9). Elävät solut estävät värin pääsyn soluun, koska väri ei pääse imeytymään ehjän solukalvon lävitse. Kuolleet solut päästävät värin sisäänsä ja värjäytyvät siniseksi. Värjäytymättömien (elävät solut) ja värjäytyneiden (kuolleet solut) solujen määrä lasketaan tietyltä alueelta, esimerkiksi kaksi A-ruutua. Viabiliteetti on yleensä 70-90%, mutta vähintään sen pitää olla 50 %. (Varan ym. 2019, 193.)



KUVA 8. Värjätty kantasolunäyte Bürkerin kammiossa viabiliteetin laskemista varten (Virtanen 2017)



KUVA 9. Näkymä mikroskoopissa. Siniseksi värjäytynyt solu on kuollut. (BiteSizeBio 2013)

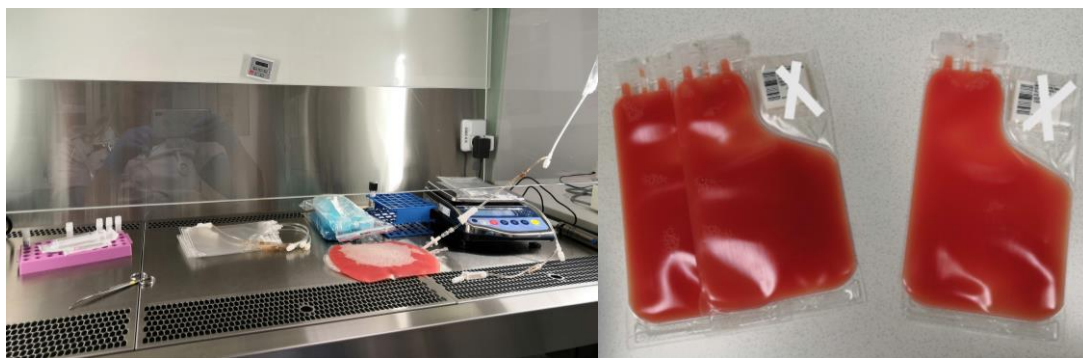
5 KANTASOLUJEN KÄSITTELY

Kantasoluja käsiteltäessä on huomioitava hyvä hygienia. Fimlab Laboratoriot Oy:ssa kantasolujen käsittely tehdään huoneessa, jossa on ylipaineistus, tuloilman hepasuodatus ja ilmastointi. Huone on taustaympäristön ilmanlaadun puhtausluokkaa D, joten sinne kuljetaan erillisen pukuhuoneen ja sulkutilan kautta. Pukuhuoneessa vaihdetaan puhtaat kengät. Kaikki aseptinen työskentely tapahtuu huoneessa olevassa laminaarivirtauskaapissa, joka on ilman puhtausluokkaa A. (Luiro 2016.)

5.1 Kantasolujen jäädytys

Ennen jäädytystä kantasoluja on mahdollista säilyttää jääkaappilämpötilassa 12 tuntia. Lämpötilan pitää olla tuolloin alle kahdeksan astetta. (Donmez ym. 2014, 191.) Jotta solut voidaan jäädyttää, ne on siirrettävä jäädytyksen kestäviin säilytyspusseihin. Lisäksi niihin lisätään jäädytysliuosta, joka suojaa soluja jäätyksen aikana. Tavallisimmin säilöntäaineena käytetään 5% DMSO:ta, joka sitoutuu veteen ja hidastaa jääkiteiden muodostumista sekä sisäisesti että ulkoisesti. (McCollough 2017, 498; Raval ym. 2017, 59.) DMSO muodostaa ohuen kalvon solun pintaan, joka estää jääkiteiden pääsyä solun sisään, mutta se myös helpottaa veden liikkumista solusta pois ilman liiallista osmoottista stressiä (Mian ym. 2017, 462). Fimlab Laboratoriot Oy:ssa solut jäädytetään niin, että valmisteessa on kymmenen prosenttia DMSO:ta ja vähintään viisi prosenttia proteiinia sisältävää liuosta, joka voi olla potilaan omaa plasmaa tai 4% albumiinia. (Siro 2019.)

Jotta osataan valmistaa oikea määrä jäädytysliuosta, on laskettava absoluuttiset solumäärät (TNC ja MNC), joissa hyödynnetään Sysmex XN-1000tm verenkuvautomaatin soluvastauksia. Tarvittavan jäädytysliuoksen määrä lasketaan afereesin leukosyyttimäärän perusteella. Kaikki määritetyt ja lasketut arvot laitetaan ylös kantasolukeräyksen koontilomakkeelle (liite 1). Kun jäädytysliuos on valmistettu, lisätään se solupussiin ja afereesi jaetaan pienempiin jäädytyspusseihin jäädytystä varten (kuva 10.). (Siro 2019.)



KUVA 10. Jäädytysliuoksen lisääminen afereesipussiin ja valmiit kantasolupussit jäädytystä varten (Virtanen 2020)

Prosessin kriittisimmät vaiheet ovat jäätyminen ja sulaminen. Jos jäähdytysnopeus on liian hidas, solun ulkoiset jääkiteet muodostuvat ja vahingoittavat soluja ulkoisen liuoksen lisääntyneen osmolaarisuuden vuoksi. Jos jäähdytysnopeus on liian nopea, muodostuu solun sisäisiä jääkiteitä, jotka voivat hajottaa soluja. (Raval ym. 2017, 60; McCollough 2017, 498.)

Eriyksen tärkeä vaihe jäädytysprosessissa on myös siirtyminen nestemäisestä kiinteään aineeseen ja siihen kuluva aika. Soluja ei saisi koskaan siirtää suoraan nestetyyppeen (-196°C), koska liian nopea jäätyminen tuhoaa soluja eniten. Eriyisesti juuri CD34+ solun pinnan antigeenit ovat erityisen herkkiä jäädytysnopeudelle. Siksi on käytettävä ohjelmoitua jäädytyslaitetta, joka laskee lämpötilaa tasaisesti. Paras jäähdytysnopeus on -1°C – -3°C minuutissa. Jos jostain syystä jäädytys keskeytyy, pitäisi solut laittaa ensin -80 asteeseen ja sitten vasta nestetyyppeen. (Abbuzzese ym. 2010, 173; Berens ym. 2016, 1325; McCollough 2017, 498; Yang, Pidgorna, Loutfy & Shuen 2014.)

Jäädytyslaitteen käyttö on melko aikaa vievää ja kallista. Tähän päivään mennessä ei ole tullut yksimielisyyttä optimaalisesta kantasolujen jäädytysprotokollasta, joten eri laboratorioissa on käytössä erilaisia jäädytysohjelmia. (Detry ym. 2014, 780.) Fimlab Laboratoriot Oy:ssa on käytössä kaksi Planer Biomed Kryo10 jäädytyslaitetta (kuva 11). Laitteen kammioyksikkö on liitetty ohjausyksikköön ja nestetyppisäiliöön. Solupussit laitetaan metallikoteloissa kammioon, jotta ne jäätyvät tasaisen ohuiksi. Laitteeseen on ohjelmoitu tietty jäädytysohjelma kantasoluja varten. Ohjelman alkulämpötila on 10°C , josta laite laskee lämpötilaa -2°C minuutissa. Kun laite saavuttaa -50°C lämpötilan jäädytysnopeus kasvaa -5°C

minuutissa. Jäädäytysohjelma on valmis, kun se saavuttaa -150°C lämpötilan. Jäädäytysohjelma kestää noin 50 minuuttia. (Siro 2017b.)



KUVA 11. Planer Biomed Kryo 10-jäädäytyslaite ja nestetyppisäiliö (Virtanen 2017)

5.2 Kantasolujen säilytys

Paras tapa säilyttää kantasoluja on nestetypen kaasufaasissa (-150°C), ei nestetyyppeen upotettuna (-196°C). Nestemäisessä työssä mikrobit pääsevät liikkumaan helposti ja vapaasti nesteessä. Jos usean potilaan soluvalmisteita säilytetään samassa nestetyppisäiliössä, voivat mikrobit kulkeutua soluista toiseen. Nestetyyppeen upotetut solupussit voivat myös rikkoutua helpommin. Kaasufaasi on siis turvallisempi säilytyspaikka kuin nestetyppi. Kuvassa 12 on nestetyppisäiliö, jossa soluja säilytetään kaasufaasissa ja joka on kytketty automaattiseen nestetypen täyttö- ja hälytysjärjestelmään. (Detry ym. 2014, 191; Abbruzzese ym. 2010, 177.)



KUVA 12. Nestetyppisäiliö (Virtanen 2020)

Abbruzzese ym. (2014) tutkivat solujen säilytystä yhden ja kahden pussin menetelmällä. He totesivat, että suurin syy solujen vaurioitumiselle jäädytyksen aikana on solun sisäisen jääkiteen muodostuminen, jota voidaan estää kaksoispussimenetelmällä. Siinä solut pakataan ja säilytetään kahdessa päällekkäin laitetussa pussissa. Kaksoispussimenetelmässä solut jäätyvät tasaisemmin ja solut olivat sulatuksen jälkeenkin hieman elinkykyisempiä. Myös potilaiden toipumisaika kantasolujensiirron jälkeen oli vuorokauden lyhyempi niillä, joiden soluja oli säilytetty kaksoispussimenetelmällä.

Säilytysaika ei sinänsä vaikuta CD34+ solujen määrään. Ainoastaan solujen jäädytys vaikuttaa. Sen jälkeen, kun solut ovat syväjäässä, voidaan niitä säilyttää jopa kymmenen vuotta eikä niiden määrä muutu. (Detry ym. 2014, 784; Donmez ym. 2014, 188.)

6 TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia jäädytyksen vaikutusta autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa. Tarkoituksena on tutkia jäädytyksen vaikutusta autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa. Vaikutusta tutkitaan CD34+ solujen määrän, soluviljelyiden kasvun ja solujen viabiliteetin avulla. Kaikista Tampereen yliopistollisessa sairaalassa tehdyistä kantasolukeräyksistä on otettu keräyksen yhteydessä kantasolunäytteitä, jotka on pakastettu erillisiin pieniin putkiin soluviljelyä varten. Tässä tutkimuksessa käytetään näytteitä, joita ei enää tarvita potilaan hoidossa. Nämä näytteet menisivät siis muuten hävitykseen. Tutkimukseen otetaan 15 näytettä, joista tehdään soluviljely, CD34 määrittäminen virtausytometrialla sekä viabiliteetti.

Tavoitteena on selvittää, kuinka paljon kantasolujen jäädytys vaikuttaa niiden määrään Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa verrattuna kansainvälisiin tutkimuksiin. Eri maiden ja jopa Suomen sisällä kantasolulaboratorioiden käytännöt ja menetelmät vaihtelevat jonkin verran. Opinnäytetyön avulla halutaan saada konkreettisia tuloksia ja tilastoja siitä, miten jäädytys vaikuttaa autologisiin kantasoluihin juuri Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa, koska tällaista tutkimusta ei ole tehty aikaisemmin kyseisessä laboratoriossa.

Tutkimuskysymykset:

1. Miten kantasolujen jäädytys vaikuttaa CD34+ solujen määrään?
2. Miten kantasolujen jäädytys vaikuttaa kantasoluviljelyn tulokseen?
3. Miten kantasolujen jäädytys vaikuttaa viabiliteettiin?

7 TUTKIMUSMENETELMÄT

Kyseessä oli kantasolujen määrää tutkiva tutkimus eli kvantitatiivinen tutkimus. Kvantitatiivinen tutkimus edellyttää aina ilmiön tuntemista. Määrällinen tutkimus on suurelta osin muuttujien mittaamista sekä niiden suhteiden välisten vuorovaikutusten laskemista. (Kananen 2011, 12.) Tämä opinnäytetyö on kokeellinen tutkimus, jolla pyritään selvittämään ilmiöiden syy-seuraussuhteita eli tässä tapauksessa jäädytyksen vaikutusta kantasolujen määrään. Kokeellisessa tutkimuksessa tutkitaan yleensä jonkin olettamuksen paikkansapitävyyttä vakioimalla kaikki muut tekijät. (Heikkilä 2014, 19.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tutkitaan muuttujia. Tilastotieteessä muuttuja on ominaisuus, joka voi saada erilaisia arvoja. Tässä tutkimuksessa muuttujiksi tulee kantasoluviljelyiden vastaukset ja CD34-mittaukset sekä viabiliteetin tulos. Tilastollisista operaatioista voidaan tässä tapauksessa käyttää keskiarvoa ja vaihteluväliä (Kananen 2011, 36-37). Tässä tutkimuksessa keskityttiin rutiinistikin suoritettaviin tutkimuksiin, jotka ovat pakollisia afereesituotteen laadun ja kantasolujen määrän varmistamiseksi. Myös Decot ym. (2012) ovat määrittäneet tärkeimmiksi kantasolujen määrää arvioitaviksi kvantitointimenetelmiksi virtaussytometrilla tehtävän CD34+ solujen määrittämisen sekä soluviljelyn CFU-GM pesäkkeiden määrän.

7.1 Tutkimusaineisto

Analysoitava tutkimusaineisto kerättiin Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa. Tutkimusaineisto koostui 15 potilaan kantasolunäytteistä, jotka olisivat muuten menneet hävitykseen. Jokaisen kantasolukeräyksen yhteydessä keräysaaliista otetaan neljä pikkuputkea myöhempiä tutkimuksia varten. Yhdestä putkesta tehdään aina jäädytyksen jälkeinen kantasoluviljely ja kolme putkia jää varalle mahdollisia muita tutkimuksia varten. Usein näitä näytteitä ei enää tarvita ja ne hävitetään puolen vuoden kuluttua siitä, kun potilas on saanut kantasolusiirron.

Potilasnäytteitä kerättiin talteen marraskuun 2018 ja helmikuun 2019 välisenä aikana. Soluviljelyitä ja CD34-määrittämiä tehtiin joulukuun 2018 ja tammikuun 2020 välisenä aikana. Tutkimuksessa oli tärkeää, että kaikki näytteet käsiteltiin ja analysoitiin samalla tavalla. Näytteet säilytetään nestetyypen kaasufaasissa (-150°C), joten ne sulatettiin juoksevan veden alla ($+37^{\circ}\text{C}$) CD34-määrittämiä ja soluviljelyä varten. Sulatuksen jälkeen näyte jaettiin kahteen putkeen, joista toisesta tehtiin soluviljely ja toinen vietiin välittömästi virtaussytometrialle analysoitavaksi. Näytteestä tehtiin myös viabiliteetti värjäys. Kuviossa 3 esitetty opinnäytetyn vaiheet.



KUVIO 3. Opinnäytetyn vaiheet

Virtaussytometrejä, joilla analysoidaan näytteitä, on kaksi. Molemmissa pystyy analysoimaan vain yhtä näytettä kerrallaan. Virtaussytometrian vastuuhoidajan kanssa sovittiin, että näytteitä analysoitiin aina kaksi kerrallaan ja hän suorittaa analysoinnin. Opinnäytetyn tekijä vastasi kantasoluviljelyiden tekemisestä. Kantasoluviljelyt ja CD34-määrittäykset tehtiin samalla tavalla kuin tavalliset potilasnäytteet.

Tulokset ennen jäädytystä saatiin kantasolukeräysten koontilomakkeista (liite 1), jotka täytetään aina keräyksen yhteydessä. Koontilomakkeista saatiin potilaiden taustatiedot, jokaisen keräyksen CD34+ solujen kokonaismäärä ($\text{CD34} \times 10^6$),

CD34+ solujen prosentuaalinen osuus, keräyksen kokonaissolumäärä ($\text{TNCx}10^6$) ja kantasoluviljelyiden (10^4 pesäkettä/kg) vastaukset ennen jäädytystä.

Kaikki tutkimuksessa tehdyt kantasoluviljelyt oli tehty jäädytetyistä kantasolunäytteistä. Joissa ensimmäinen viljely on tehty melko pian jäädytyksen jälkeen ja toinen viljely säilytyksen jälkeen. Tämän vuoksi helmikuun 2020 aikana tehtiin myös testinä muutama kantasoluviljely ja viabiliteetti suoraan keräyspussista ennen jäädytystä, koska haluttiin testata myös kuinka paljon viljelyn ja viabiliteetin tulokset eroavat niissä tapauksissa.

7.2 Kantasolujen virtausytometrinen määrittäminen

Näytteen jakamisen jälkeen näytteestä tehtiin laimennos 1:10. Alkuperäinen näyte ja laimennos vietiin Sysmex XN-1000tm laitteelle ajettavaksi. Vastaustulokset otettiin talteen ja laimennettu näyte vietiin virtausytometrialle analysoitavaksi.

Mittauksessa käytettiin Stem-Kittm reagenssikittiä, jonka sisältämät reagenssit olivat: CD45-FITC / CD34-PE vasta-aine, CD45-FITC / IsoClonic Control-PE vasta-aine, Stem-Count helmet, 7-AAD viabiliteettiväri ja 10 X NH_4CL lyysausliuos. Jokaiselle näytteelle otettiin kolme putkea, joihin vasta-aineet ja näyte pipetoitiin taulukon 2 mukaisessa järjestyksessä.

TAULUKKO 2. Putkiin pipetoitavien näytteiden ja reagenssien määrät

Reagenssi/Näyte	Putki 1.	Putki 2.	Putki.3
CD45-FITC/CD34-PE	20 μl	20 μl	
CD45-FITC/IsoClonic Control-PE			20 μl
7-AAD viabiliteettiväri	20 μl	20 μl	20 μl
Näyte	100 μl	100 μl	100 μl

Pipetoinnin jälkeen putkia inkuboitiin 20 minuuttia valolta suojattuna huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen lisättiin kaksi millilitraa lyysaus- eli hajoitusliuosta punasolujen hajotusta varten, sekoitettiin VORTEX GENIE 2 –koeputkiravistelijassa

viisi sekuntia ja inkuboitii 10 minuuttia valolta suojattuna huoneenlämmössä. Lopuksi lisättiin 100 mikrolitraa helmiä, sekoitettiin viisi sekuntia ja mitattiin virtaus-sytometrilla.

Virtaussytometrilla saatiin määritettyä CD34+ solujen prosentuaalinen osuus näytteistä, jonka avulla laskettiin kantasolujen kokonaismäärä jäädytyksen jälkeen. Koontilomakkeista katsottiin, mikä oli näytteen kokonaissolumäärä jokaista millilitraa kohden (TNC 10^6 /ml) ja mikä oli keräyssaaliin tilavuus. Kantasolujen kokonaismäärä jäädytyksen jälkeen laskettiin seuraavalla laskukaavalla:

$$\frac{(Keräyksen\ TNC \times 10^6\ /ml) \times (Afereesin\ tilavuus\ ml) \times (CD34\ pos.\ solut\ \%)}{100}$$

7.3 Kantasoluviljely

Kantasoluviljelyssä käytettiin Iscove's Modified Dulbecco's mediumia, johon oli lisätty viisi millilitraa Penicillin-Streptomyciniä. Viljelyalustana käytettiin Methocult GF:ää (methylcellulose medium with recombinant cytokines).

Sulatettu näyte siirrettiin kymmenen millilitran suuruiseen putkeen ja se pestiin kaksi kertaa. Soluihin lisättiin mediumia siten, että suspensiota oli yhteensä kymmenen millilitraa. Näytettä sentrifugoitiin nopeudella 1130 rpm kymmenen minuuttia ja poistettiin supernatantti. Pesuvaiheiden jälkeen solut suspensioitiin mediumilla siten, että saatiin sopiva laimennos verenkuvaa-analysaattorille. Tässä vaiheessa oli huomioitava, mikä oli ollut näytteen CD34 prosentti. Jos prosentti oli alle yksi, tehtiin vahvempi laimennos ja päinvastoin.

Maljalle laitettiin kasvamaan aina sama määrä soluja. Jos CD34+ soluja oli alle 1%, maljalle laitettiin 5×10^4 solua/ml. Jos CD34+ soluja oli yli 1%, maljalle laitettiin 5×10^3 solua/ml. Verenkuvaa-analysaattorin leukosyyttitulosta tarvitaan siihen, että osataan laskea maljalle laitettava solumäärä, joka lasketaan seuraavia laskukaavoja käyttäen:

CD34+ soluja alle 1%:

$$\frac{0,5 \times 10^6 / \text{ml}}{\text{Verenkuva} - \text{analysaattorin leukosyytti arvo} (10^6 \text{ ml})}$$

CD34+ soluja yli 1%

$$\frac{0,05 \times 10^6 / \text{ml}}{\text{Verenkuva} - \text{analysaattorin leukosyytti arvo} (10^6 \text{ ml})}$$

Haluttu solumäärä lisättiin neljään millilitraan viljelymediumia ja se jaettiin kahdelle viljelymaljalle, jotta saatiin kaksi rinnakkaista maljaa. Kaikkia viljelmiä inkuboitii 37°C:ssa soluviljelykaapissa kostutetussa ilmassa, jonka hiilidioksidipitoisuus oli 5% (CO₂). Viljelyitä kasvatettiin kaksi viikkoa, jonka jälkeen pesäkkeet laskettiin maljoilta mikroskoopin avulla.

Näytteistä laskettiin granulositytti-makrofagipesäkkeet sekä punasolupesäkkeet. Samoin kuin tehdään rutiininäytteille. Näytteistä vastattiin CFU-GM pesäkkeiden määrä potilaan painokiloa kohden, mikä laskettiin kappaleessa 4.4. (s.29) esitetyn kaavan mukaisesti riippuen mikä oli näytteessä ollut CD34%. Pesäkkeet laskettiin kahdelta eri maljalta ja tulokseksi vastattiin niiden keskiarvo.

7.4 Viabiliteetti

Kantasolujen viabiliteetti laskettiin samasta näytteestä, josta tehtiin kantasoluviljely. DMSO oli pesty pois ennen viljelyä, joten näytteessä ei ollut säilöntäainetta viabiliteetti värjäyksen aikana. Menetelmänä oli näytteen vitaalivärjäys ja kammiolaskenta.

Trypan blue -väristä on tehty valmis 0,2 prosenttinen käyttöliuos veteen, joka laimennetaan ennen käyttöä fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (PBS 10 x stock solution) (450 µl + 50 µl). Viabiliteetti värjäys tehtiin sekoittamalla yksi osa laimennettua Trypan blue -liuosta ja yksi osa näytettä. Väriliuos-solususpensio laitettiin Bürkerin laskukammioon ja värjäytymättömien (elävät solut)

sekä värjäytyneiden solujen (kuolleet solut) määrä laskettiin kahdesta A-ruudusta eri puolilta kammiota. Tulos saatiin jakamalla elävien solujen määrä kokonaissolumäärällä (elävät + kuolleet solut). Lopuksi tulos kerrottiin sadalla.

7.5 Aineiston analysointi

Aineistosta saatiin tietoa CD34-solujen määrästä sulatuksen jälkeen ja näytteissä tapahtuneista muutoksista. Kantasoluviljelyiden ja viabiliteetin tulokset käytiin läpi tammikuun 2020 aikana ja CD34-määrityksien tulokset huhtikuun 2020 aikana. Aineisto kirjattiin Microsoft Office Excel taulukkolaskenta -ohjelmaan kaikkien annettujen numeraalisten arviointien osalta. Aineistoista laskettiin keskiarvoja, määriä ja prosentteja sekä tarkasteltiin alhaisimpia ja korkeimpia lukemia niin kantasoluviljelyiden, viabiliteetin ja CD34-määritysten osalta. Lisäksi tarkasteltiin muutosta kaikkien tutkittavien osa-alueiden osalta. Sen jälkeen tulokseksi saatu olennaisimmat tulokset kirjoitettiin auki ja kuvattiin diagrammeilla.

8 TULOKSET

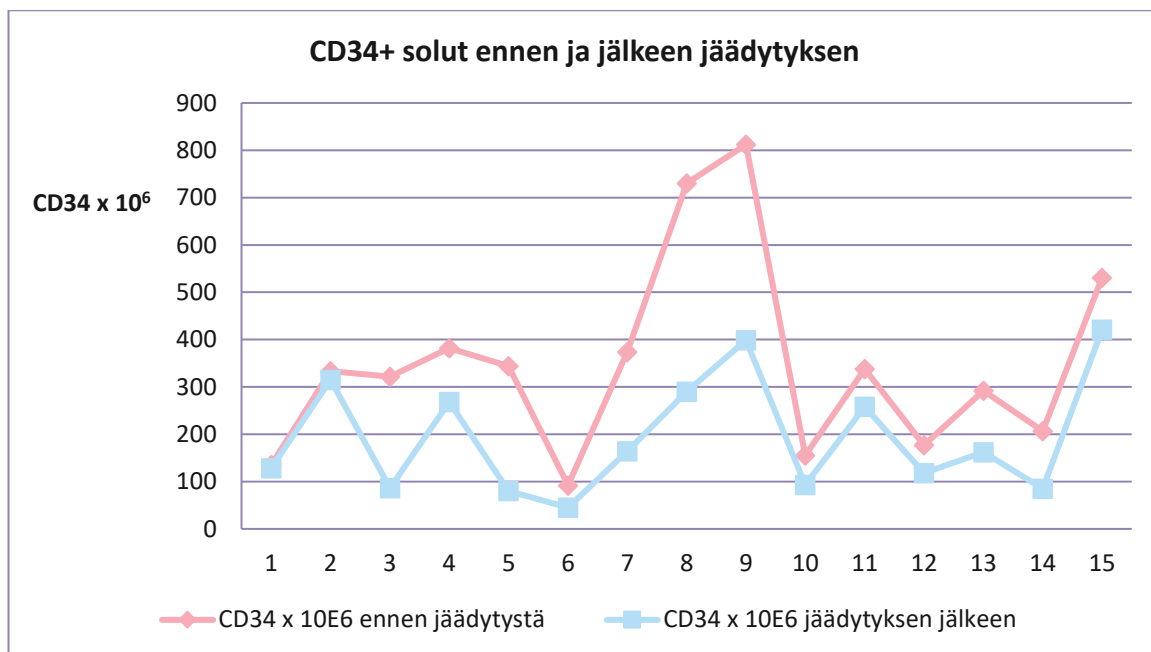
CD34-määrittäminen ja kantasoluviljely tehtiin 15 potilaan näytteillä, joille oli tehty autologinen kantasolukeräys. Tutkimuspopulaatiossa oli 11 naista ja 4 miestä, joiden mediaani-ikä oli 57 vuotta (vaihteluväli 1-73 vuotta). Potilaiden diagnoosit olivat multipple myelooma (n=9), lymfoomat (n=5) ja tuumori (n=1).

8.1 CD34+ solujen määrät

CD34-määrittämisessä kaikkien potilaiden (n=15) vastaukset laskivat. Kantasolujen kokonaismäärä näytteissä oli keskiarvoltaan ennen jäädytystä $458 \text{ CD34} \times 10^6$ (vaihteluväli $92\text{--}812 \text{ CD34} \times 10^6$) ja jäädytyksen jälkeen $194 \text{ CD34} \times 10^6$ (vaihteluväli $45\text{--}421 \text{ CD34} \times 10^6$). Jokaisesta näytteestä laskettiin myös, kuinka monta prosenttia kantasolujen määrä vähentyi. Parhaiten säilyneessä näytteessä kantasolujen määrä laski vain 5,2% ja huonoiten säilyneessä näytteessä kantasolujen määrä laski 76,7%. Keskimäärin kaikissa näytteissä (n=15) kantasolujen määrä laski 42%. Tulokset on esitetty taulukossa 3 ja kuviossa 4 diagrammeina.

TAULUKKO 3. CD34-määrittäysten kokonaistulokset näytteissä

Näyte-numero	CD34 x 10^6 ennen jäädytystä	CD34 x 10^6 jäädytyksen jälkeen	Erotus	Vähentyi %
1	135	128	-7	5,2
2	333	315	-18	5,4
3	322	86	-240	73,3
4	382	268	-114	29,8
5	344	80	-264	76,7
6	92	45	-47	51,1
7	374	164	-210	56,1
8	730	290	-440	60,3
9	812	399	-413	50,9
10	155	93	-62	40
11	338	258	-80	23,7
12	177	118	-59	33,3
13	292	162	-130	44,5
14	207	85	-122	58,9
15	531	421	-110	20,7

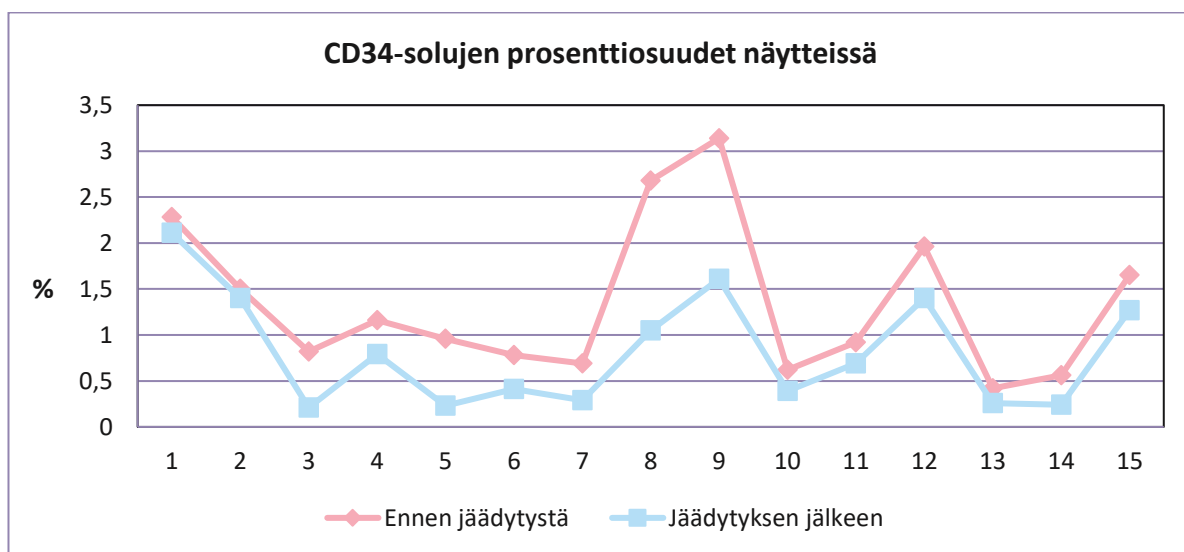


KUVIO 4. CD34-määritysten kokonaistulokset

Kantasolujen prosentuaalinen keskiarvo näytteissä ennen jäädytystä oli 1,34% (vaihteluväli 0,42-2,68%) ja jäädytyksen jälkeen 0,82% (vaihteluväli 0,24-2,11%). Kantasolujen prosentuaalinen määrä keskiarvoisesti väheni jäädytyksen aikana siis 38,8%. Parhaiten säilyneessä näytteessä kantasolujen prosenttiosuus laski 7,5% ja huonoiten säilyneessä näytteessä kantasolujen prosenttiosuus laski 76,0%. Kantasolujen prosenttiosuudet näytteissä on esitetty numeraalisesti taulukossa 4 ja kuviossa 5 viivadiagrammina.

TAULUKKO 4. CD34-solujen prosenttiosuudet näytteissä

Näyte-numero	CD34% ennen jäädytystä	CD34% jäädytyksen jälkeen	Erotus	Vähentyi %
1	2,28	2,11	-0,17	7,5
2	1,50	1,40	-0,10	6,7
3	0,82	0,21	-0,61	75,4
4	1,16	0,79	-0,37	31,9
5	0,96	0,23	-0,73	76,0
6	0,78	0,41	-0,37	47,4
7	0,69	0,29	-0,40	58,0
8	2,68	1,05	-1,63	60,8
9	3,14	1,61	-1,53	48,7
10	0,62	0,39	-0,23	37,1
11	0,92	0,69	-0,23	25,0
12	1,96	1,4	-0,56	28,6
13	0,42	0,26	-0,16	38,1
14	0,56	0,24	-0,32	57,1
15	1,65	1,27	-0,38	23,0



KUVIO 5. CD34% näytteissä ennen ja jälkeen jäädytyksen

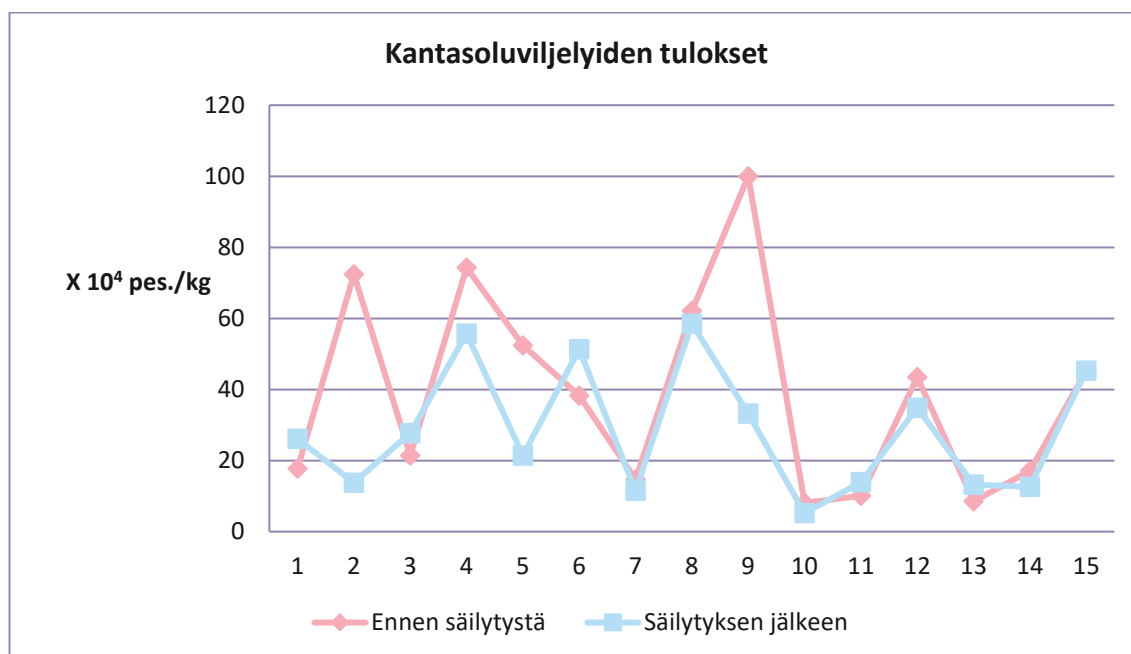
8.2 Kantasoluviljelyt tutkimuksessa

Viljelyn tulos kasvoi kuudessa (40%) viljelyssä ja vähentyi yhdeksässä (60%) viljelyssä. Viljelyiden tulosten keskiarvo ennen säilytystä oli $39,1 \times 10^4$ pesäkettä/kg ja säilytyksen jälkeen $28,3 \times 10^4$ pesäkettä/kg. Joten voidaan sanoa, että viljelyiden tulokset laskivat keskimäärin 27,6%. Taulukossa 5 on kantasoluviljelyiden

tulokset numeraalisesti ennen solujen säilytystä ja sen jälkeen. Lisäksi kuviossa 6 on esitetty tulokset viivadiagrammeina.

TAULUKKO 5. Kantasoluviljelyiden tulokset

Näyte-numero	Ennen säilytystä x10 ⁴ pesäkettä/kg	Säilytyksen jälkeen x10 ⁴ pesäkettä/kg	Erotus	Kasvoi/Vähentyi %
1	17,7	26,1	+8,4	+47,5%
2	72,4	13,8	-58,6	-81,0%
3	21,4	27,7	+6,3	+29,4%
4	74,3	55,7	-18,6	-25,0%
5	52,4	21,4	-31,0	-59,2%
6	38,3	51,3	+13,0	+33,9%
7	14,7	11,5	-3,2	-21,8%
8	62,1	58,5	-3,6	-5,8%
9	100	33,2	-66,8	-66,8%
10	8,1	5,2	-2,9	-35,8%
11	10,1	13,9	+3,8	+37,6%
12	43,5	34,8	-8,7	-20%
13	8,5	13,2	+4,7	+55,3%
14	17,1	12,6	-4,5	-26,3%
15	45,2	45,3	+0,1	+0,2%



KUVIO 6. Kantasoluviljelyiden tulokset ennen ja jälkeen säilytyksen

Helmikuussa tehdyissä testiviljelyissä, jotka tehtiin suoraan keräyspussista. Ennen jäädytystä tehdyissä testiviljelyissä saadut tulokset on esitetty taulukossa 6. Näissä näytteissä viljelyn tulokset laskivat 44,4%, 68,4% ja 73,3%. Myös viabiliteetti oli kaikissa laskenut.

TAULUKKO 6. Testiviljelyiden tulokset ja viabiliteetit niissä ennen ja jälkeen jäädytyksen

Näyte-numero	Viabiliteetti testiviljely näytteessä ennen jäädytystä	Ennen jäädytystä $\times 10^4$ pesäkettä/kg	Viabiliteetti testiviljely näytteessä jäädytyksen jälkeen	Jäädytyksen jälkeen $\times 10^4$ pesäkettä/kg
TESTI1	99%	25,0	93%	13,9
TESTI2	99%	52,2	96%	16,5
TESTI3	88%	65,9	81%	17,6

8.3 Viabiliteetti

Viabiliteetti saatiin näytteistä ainoastaan sulatuksen jälkeen. Näytteiden viabiliteettien keskiarvo oli 86% (vaihteluväli 69-96%) eli se oli kaikissa näytteissä hyvä. Taulukossa 7 on esitetty viabiliteetin tulokset jäädytyksen ja sulatuksen jälkeen.

TAULUKKO 7. Viabiliteetin tulokset

Näyttenumero	Viabiliteetti jäädytyksen jälkeen (%)
1	88
2	80
3	69
4	69
5	90
6	96
7	90
8	88
9	80
10	80
11	95
12	94
13	96
14	96
15	86

9 POHDINTA

Tässä tutkimuksessa arvioitiin jäädytyksen vaikutusta 15 perifeerisen veren kantasolujen siirteeseen jäädytyksen, kylmäsäilytyksen ja sulatuksen jälkeen. Opinnäytetyöprosessin alussa aiheesta keskusteltiin laboratoriohematologin ja kantasolulaboratorion vastuuhoitajan kanssa ja lopullinen aihe muodostui kantasolulaboratorion vastaavan hematologin toiveiden mukaisesti. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia jäädytyksen vaikutusta autologisiin kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa. Tarkoituksena oli tutkia jäädytyksen vaikutusta autologisiin kantasoluihin CD34+ solujen määrän, soluviljelyiden kasvun sekä solujen viabiliteetin avulla. Tavoitteena oli selvittää, kuinka paljon kantasolujen jäädytys vaikuttaa niiden määrään Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratoriossa verrattuna kansainvälisiin tutkimuksiin.

Kantasoluja tutkittaessa on tärkeää ymmärtää solujen syntymismekanismeja ja CD34+ solun ominaisuuksia. Lisäksi on hyvä tiedostaa autologisten kantasolusiirtojen perusteet. Sen vuoksi opinnäytetyössä käsiteltiin hematopoieesi, autologiset kantasolusiirrot hoitomenetelmänä, kantasolujen tutkimista ja käsittelyä pääpiirteittäin. Näin lukija saa hyvän kokonaiskuvan aiheesta.

Opinnäytetyön tekijälle aihe oli mielenkiintoinen ja tärkeä, koska hän työskentelee itsekin kantasolulaboratoriossa ja kantasolujen säilyvyys on keskeinen tekijä kantasolujen siirtoprosessissa. Kantasolujen keräysvaiheessa on huomioitava kantasolujen säilyminen, jotta niitä osataan kerätä oikea määrä. Määrässä on huomioitava jäädytyksen vaikutus soluihin ja soluja on kerättävä hieman ylimääräisiä, jotta niitä olisi jäljellä riittävästi vielä siirtovaiheessa. Kirjallisuuden mukaan kerättävä määrä pitäisi olla $2-4 \times 10^6/\text{kg}$ (Itälä-Remes & Volin 2015, 471). Jäädytyksen vaikutus on otettu huomioon jo keräystavoitteessa ja siksi Tampereen yliopistollisessa sairaalassa kerättäväksi määräksi on asetettu $3 \times 10^6/\text{kg}$ (Siro 2019).

9.1 Tulosten tarkastelu

Näissä viidentoista potilaan näytteissä kantasolujen kokonaismäärä ($CD34 \times 10^6$) laski keskimäärin 42 prosenttia ja näytteiden kantasoluprosentti laski keskimäärin 38,8 prosenttia. Kantasoluviljelyssä tulokset olivat vaihtelevia, mutta niidenkin tulos laski yhteensä keskimäärin 27,6 prosenttia. Viabiliteetti puolestaan oli kaikissa hyvä, keskimäärin 86 prosentti.

Solujen määrä laskee solujen jäädytyksestä johtuen, mutta määrällisesti lasku on hyvin vaihtelevaa. Se voi johtua monestakin eri syystä esimerkiksi potilaan iästä ja sairauden tyypistä tai siirteen solukoostumuksesta. Jos afereesi sisältää paljon granulosityttejä ja/tai trombosyyttejä, voi se vähentää solujen elinkelpoisuutta, koska niistä vapautuvat entsyymit voivat olla haitallisia mononukleaarille soluille. (Tiwari ym. 2016, 93.) Yhtenä vaihtoehtona olisi poistaa verihiutaleet hitaasti sentrifugoimalla ennen jäädytystä, mutta Fimlab Laboratoriot Oy:ssa tätä vaihetta ei tehdä. Granulosityttejä on puolestaan vaikeampi poistaa. Toinen sulatuksen jälkeinen määrittäminen, joka tehtiin tässä tutkimuksessa, oli kantasoluviljely. Lisäksi sulatetusta kantasolunäytteestä laskettiin viabiliteetti.

Kantasolujen määrä sekä kyky toipua ja jakaantua heikentyvät aina jäädytyksen aikana. Kantasoluviljelyiden maljakasvulla mitataan solujen kykyä toipua ja jakaantua eli sen avulla tutkitaan solujen elinkykyisyyttä. Viabiliteetillä tutkitaan myös solujen elinkykyisyyttä, mutta siinä tarkastellaan puolestaan elävien solujen määrää näytteessä. Soluviljely ja viabiliteetti eivät siis suoraan korreloi toisiinsa. Se näkyi myös tässä opinnäytetyössä, sillä kantasoluviljelyn tuloksissa oli jonkin verran vaihtelua: osassa viljelyn tulos jopa nousi (40%:ssa) ja osassa laski (60%:ssa). Viabiliteetin tulokset puolestaan olivat tasaisen hyviä eikä niissä havaittu suurta vaihtelua.

Kantasoluviljelyiden tulokset eivät myöskään suoraan vastanneet tutkimuskysymykseen jäädytyksen vaikutuksesta, koska näytteitä ei oltu viljelty ennen jäädytystä missään vaiheessa. Ensimmäinen viljely oli tehty tosin yleensä jäädytystä seuraavana päivänä, kun taas toinen viljely jopa vuosien säilytyksen jälkeen. Sen vuoksi jouduttiin tekemään muutama uusi testiviljely suoraan keräyspussista ennen jäädytystä, jotka vastaavat paremmin tutkimuskysymykseen.

Solun sisällä on vettä ja jos kantasoluja jäädytetään liian nopeasti, vesi solun sisällä jäätyy ja muodostuu solunsisäisiä kiteitä. Liiallinen kiteiden muodostuminen aiheuttaa solukuolemaa. Hitaammalla jäädyttämisellä estetään sisäisten kiteiden syntymistä. Silloin kiteitä muodostuu lähinnä solunulkoisesti ja soluvaurioita syntyy vähemmän. Jäädytysnopeudesta huolimatta tarvitaan kuitenkin solujen suoja-ainetta, DMSO:ta, jotta minimoidaan jääkiteiden syntyminen. (Raval, McKay & Park 2017, 60; Mian ym. 2017, 463; McCollough 2017, 498.)

Tämän opinnäytetyön aineisto oli melko suppea. Jotta voitaisiin yleistää tutkimuksen tuloksia, pitäisi tehdä laajempi tutkimus suuremmalla otoskoolla. Tämä työ antoi kuitenkin suunnan sille, kuinka paljon jäädytys vaikuttaa kantasoluihin ja tässä työssä vaikutus oli yllättävän suuri. Vastaavia tutkimuksia on tehty maailmassa useita esimerkiksi Saksassa vuonna 2016 (Berens ym. 2016) ja Turkissa vuonna 2014 (Donmez ym. 2014) tehdyt tutkimukset. Donmez ym. 2014 tutkimuksessa CD34+ solujen kokonaismäärä laski 38,4%, mikä on saman suuntainen, kuin tässä tutkimuksessa saatu 42%.

Suppeasta aineistosta huolimatta tutkimus oli todella tärkeä, koska kantasolujen käsittelyvaiheet ja laadunvarmistusmenetelmät vaihtelevat eri maiden ja jopa saman maiden kantasolulaboratorioiden välillä paljonkin. Tällä opinnäytetyöllä saatiin siis tietoa jäädytyksen vaikutuksista Fimlab Laboratoriot Oy:n kantasolulaboratorion toimintatavoilla ja menetelmillä.

9.2 Luotettavuus

Tutkimuksen tuloksia arvioitiin keskiarvojen avulla, koska keskiarvo kuvaa aineiston jakauman sijaintia. Keskiarvo on vakaa suure, jos havaintojen lukumäärä on suuri. (Heikkilä 2014, 83.). Tässä opinnäytetyössä havaintojen määrä jäi pieneksi, joten äärihavaintojen vaikutus keskiarvoon voi olla hyvinkin huomattava. Tulokset kuitenkin olivat saman suuntaisia, kuin aiemmissa kansainvälisissä tutkimuksissa. Voidaan siis sanoa, että nämä keskiarvot antavat hyvän suunnan jäädytyksen vaikutukseen kantasoluihin Fimlab Laboratoriot Oy:ssä.

Kokeellisen tutkimuksen onnistumisen tärkein asia on luotettavat vastaukset (Heikkilä 2014, 29). Tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida validiteetin avulla. Validiteetti mittaa sitä, että tutkimuksen ongelman kannalta on mitattu oikeita asioita. (Kananen 2011, 118-119.) Tässä tutkimuksessa huomioitiin validiteetti jo tutkimuksen alussa ja tutkimukseen valittiin sellaiset tutkimukset, joilla saatiin vastaus tutkimusongelmaan. Yksi validiteetin tärkeimmistä huomioista onkin, että se pitää huomioida jo tutkimuksen alussa huolellisella suunnittelulla (Heikkilä 2014, 27). Tutkimuksen mittarina käytettiin kantasoluviljelyä, viabiliteettia ja CD34-määrittystä, jotka ovat rutiinisti käytössä Fimlab Laboratoriot Oy:ssä, joten niiden käyttäminen oli luotettavaa ja juuri niillä mittareilla mitattiin sitä, mitä pitikin eli mittari oli validi. Voidaan siis sanoa, että tulokset olivat luotettavia.

Sisäisellä validiteetilla tarkoitetaan tutkimuksen systemaattista luotettavuutta. Sitä on vaikea arvioida, mutta sitä lisäävät tutkimusprosessin dokumentointi, käsitteiden määrittely ja teoriaan pohjautuminen. (Kananen 2011, 124.) Tässä opinäytetyössä määriteltiin käsitteet huolellisesti ja kaikki teorian tieto pohjautui pääosin alle kymmenen vuotta vanhoihin lähteisiin. Ulkoinen validiteetti puolestaan tarkoittaa tulosten yleistettävyyttä eli sitä, miten hyvin tutkimustulokset vastaavat perusjoukkoa (Kananen 2011, 124). Jos otoskoko on liian pieni, voivat tulokset olla sattumanvaraisia (Heikkilä 2014, 28). Aineisto kerättiin vain yhdestä sairaalasta ja otoskoko oli melko pieni. Toisaalta opinäytetyön toimeksiantaja halusi tutkia juuri kyseisen kantasolulaboratorion kantasoluvastauksia ja ohjeistus otoskokoon tuli toimeksiantajalta.

Tuloksia ei voida yleistää, mutta tutkimuksen tulokset antavat arvokasta tietoa laboratoriolle. Vastaavaa tutkimusta ei ole tehty aikaisemmin kyseissä kantasolulaboratoriossa ja tällä tutkimuksella saatiin hyvää viitettä siitä, kuinka paljon kantasoluja häviää kyseisen laboratorion menetelmillä. Otos edusti myös melko hyvin perusjoukkoa. Opinäytetyötä tehdessä ei myöskään löydetty vastaavia tutkimuksia, joita olisi tehty aikaisemmin Suomen kantasolulaboratorioissa, joten tutkimus antaa siitä näkökulmasta uutta tietoa.

Reliabiliteetilla puolestaan tarkoitetaan tulosten pysyvyyttä. Se tarkoittaa sitä, että saataisiin samat tulokset, jos tutkimus toistettaisiin. Jos kvantitatiivisen tutki-

muksen vaiheet voidaan toistaa ja vaiheet on dokumentoitu tarkasti, on tutkimuksen reliabiliteetti kunnossa. (Kananen 2011, 118-119,123.) Tämän tutkimuksen aikana kaikki työvaiheet kirjattiin ylös ja työohjeita noudatettiin tarkasti. Vaihtelua syntyi ainoastaan siinä, kohtaa kun näytteitä määritettiin Sysmex XN-1000tm-verenkuva-analysaattorilla. Välillä joutui odottamaan hetken aikaa, ennen kuin näyte saatiin analysaattorille. Ajallinen eroavaisuus on kuitenkin niin pieni, ettei sillä katsota olevan vaikutusta tutkimuksen reliabiliteettiin.

Tutkimuksen täytyy olla luotettava ja tulosten tarkkoja. Kaikki näytteet käsitellään samalla tavalla saman henkilön toimesta, jotta päästään mahdollisimman yhden mukaisiin tuloksiin. Tutkijan pitää olla koko tutkimuksen ajan kriittinen, tarkka ja puolueeton. (Heikkilä 2014, 28.)

9.3 Eettisyys

Tutkimus toteutettiin hyvää tieteellisiä käytäntöjä ja eettisiä ohjeita noudattaen. Tutkimuksen on aina oltava rehellistä ja puolueetonta, eikä se saa aiheuttaa haittaa tutkimuksen kohteena oleville (Heikkilä 2014, 27). Tässä opinnäytetyössä käytettiin kantasolunäytteitä, joita potilas ei enää tarvitse ja jotka menisivät muuten hävitykseen. Hoidon eettisyys perustuu potilaan itsenäisyyteen ja itsemääräämisoikeuteen, jota tukee laki potilaan asemasta ja oikeuksista (785/1992). Jokainen kantasoluhoidoihin ryhtyvä potilas täyttää ennen hoitoja kantasolusiirteen säilytys sopimuksen, jossa hän voi antaa luvan tai kieltäytyä solujen antamisesta tutkimuskäyttöön. Ennen tutkimuksen tekemistä varmistettiin, että käytetään vain niiden potilaiden soluja, jotka ovat antaneet luvan kantasolujen tutkimuskäyttöön. Tutkimuksessa käytettiin potilaiden näytteiden, joiden tutkimuskäyttöön antamisesta he olivat tehneet tietoisuuden suostumuksen. Tietoinen suostumus koostuu sekä tietoisuudesta, että suostumuksesta. Jotta ihminen voi olla tietoinen jostakin asiasta, on hänen perehdyttävä asioihin.

Ammattihenkilöiden on annettava potilaalle riittävästi tietoa asioista, jotka ovat suostumuksen kohteena. (Välimäki 2015, 152.) Ennen kantasolujen keräämistä, potilas ja lääkärit pitävät hoitoneuvottelun. Lääkäri käy potilaan kanssa läpi kaikki

tarvittavat tiedot ja sen jälkeen potilas täyttää kantasolusiirteen säilytys sopimuksen, joten voidaan ajatella, että potilaalla on riittävät tiedot kantasolujen keräyksestä ja palautuksesta. Suostumus puolestaan merkitsee sitä, että potilas antaa luvan omien tuntemustensa perusteella. Lisäksi potilaan on oltava kykenevä antamaan suostumus. (Välimäki 2015, 153-155.) Sen jälkeen, kun potilaan solut hävitetään tai otetaan tutkimus käyttöön, ei potilas saa tietää mitä hänen soluilleen on tapahtunut.

Ennen tutkimuksen aloittamista kantasolulaboratorion henkilökunnalle kerrottiin tulevasta tutkimuksesta. Tutkimus suoritettiin siten, ettei laboratorion normaalitoiminta häiriintynyt. Kantasoluviljelyt tehtiin silloin, kun kantasolulaboratoriossa ei ollut muita rutiiniin liittyviä töitä tai potilasnäytteitä. Kantasolunäytteet virtaussytopetrialla ajettiin, kun ei ollut muita CD34-määryksiä teossa. Tässä tutkimuksessa noudatettiin myös tietosuojaa eikä potilaiden henkilötietoja tule esille. Kaikki näytteet käsiteltiin näytenumeroilla ilman henkilötietoja sekä kantasoluviljelyyn, että CD34 määrytyksen yhteydessä. Opinnäytetyön valmistuttua aineisto hävitettiin.

Ennen tutkimusta perehdyttiin teoreettiseen viitekehykseen. Joten opinnäytetyöntekijällä oli hyvät pohjatiedot tutkimuksen tekemiseen. Lisäksi tutkija on työskennellyt useamman vuoden kantasolulaboratoriossa, joten työskentely siellä oli jo entuudestaan tuttua. Tutkimus suoritettiin rehellisesti ja tarkasti. Kaikki vaiheet tehtiin samalla tavalla, samojen henkilöiden toimesta. Lisäksi tulokset on esitetty, niin kuin ne todellisuudessa olivat eikä niitä kaunisteltu. Eettisesti haastavaa oli, että opinnäytetyöntekijänä piti toimia mahdollisimman neutraalisti. Aikaisempi kokemus kantasolulaboratoriossa työskentelystä toi kuitenkin tiettyjä ennakkoletuksia tuloksista, mutta ne pyrittiin poistamaan kokonaan.

Kaikki tutkimuksen vaiheet tehtiin huolellisesti tutkimussuunnitelmasta tulosten analysointiin sekä raportointiin. Raportissa käytetyt lähteet olivat mahdollisimman tuoreita, enintään kymmenen vuotta vanhoja. Vain kaksi lähdettä oli vanhempia ja niitäkin käytettiin vain siltä osin, kuin tieto ei ole muuttunut. Lähdesynteesiä pyrittiin käyttämään mahdollisimman paljon. Suurin osa lähteistä oli kansainvälisiä artikkeleita, jotka sisälsivät ajankohtaista tietoa asioista. Lisäksi valittuja lähteitä tarkasteltiin kriittisesti ja kaikkiin viitattiin koulun ohjeistuksen mukaisesti.

Eri laboratorioiden välillä on erilaisia tutkimuskäytäntöjä. Tässä opinnäytetyössä kantasolujen tutkiminen kappaleessa käytettiin laboratoriokäytäntöjen kuvaamiseen paljon Fimlab Laboratoriot Oy:n ohjeistuksia, koska se toimi työn toimeksiantajana ja työssä haluttiin noudattaa toimeksiantajan ohjeistuksia. Myös käytännön osuus tehtiin toimeksiantajan työohjeita noudattaen.

10 JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUSAIHEET

Tämä oli ensimmäinen Fimlab Laboratoriot Oy:ssa tehty kooste ja systemaattinen tilasto jäädytyksen vaikutuksesta kantasoluihin ja siten tutkimuksena erittäin tärkeä juuri kyseiselle laboratoriolle. Ensimmäistä kertaa saatiin haluttua tietoa kyseisestä aiheesta ja toimeksiantaja oli tyytyväinen tuloksiin. Nyt laboratoriollla on konkreettista näyttöä jäädytyksen vaikutuksista kantasoluihin, kun aiemmin tieto perustui ainoastaan kansainvälisiin tutkimuksiin. Tulokset olivat hyvin järkeenkäyviä ja on tiedossa, että CD34+ solujen määrä voi laskea jopa 50%. (Rounioja 2020.) Vahvistettiin käsitys siitä, kuinka paljon jäädytys vaikuttaa kantasoluihin. Tätä väitettä tukee myös testiviljelyinä suoraan keräyspussista tehdyt viljelmät, joissa tulos laski keskimäärin 62%. Eli kantasoluviljelyn tulos oli keskimäärin 62% korkeampi näytteissä, joita ei jäädytetty ollenkaan.

Jatkotutkimusaiheena voisi olla jäädytysprosessin tutkiminen. Fimlab Laboratoriot Oy:ssa on jo vuosien ajan käytetty samaa jäädytysohjelmaa. Nyt voisi kokeilla solujen jäädyttämistä esimerkiksi hitaammalla jäädytys ohjelmalla. Tutkimuksissaan Yang, Pidgorna, Loutfy ja Shuen (2014) tutkivat juuri solujen jäädytysnopeutta ja sitä, mitä tapahtuu, jos jäädytys syystä tai toisesta keskeytyy. Heidän mukaansa solujen elinkykyisyyden kannalta kriittisin asia on solujen jäädytysnopeus. Heidän tutkimuksiensa mukaan paras jäädytysnopeus on 1-2,5 astetta minuutissa. Morgenstern ym. (2016) osoittivat tutkimuksessaan, että jäädytysprosessilla voidaan vaikuttaa optimaaliseen kantasolusiirtoon ja siirteen tarttumiseen. Heidän tutkimuksessaan suositeltiin jäädytysnopeudeksi 1-2 astetta minuutissa ainakin siihen asti, kunnes afereesi saavuttaa -40 asteen lämpötilan.

Fimlab Laboratoriot Oy:ssa jäädytys prosessi alkaa jo alusta 2 astetta minuutissa ja kun laite saavuttaa -50 asteen lämpötilan jatkaa se jäädytystä 5 astetta minuutissa. Herää siis kysymys onko jäädytys liian nopea. Yang, Pidgorna, Loutfy ja Shuen (2014) totesivat tutkimuksissaan, että jos ei ole käytössä ohjelmoitavaa jäädytyslaitetta solut voisi laittaa suoraan -80 asteiseen pakastimeen ja sieltä myöhemmin siirtää nestetyppeen. Olisiko siis hyvä, että jäädytys prosessi olisi -2 astetta siihen asti, kunnes laite saavuttaa -80 asteen lämpötilan ja vasta sen jälkeen lisäisi jäädytys nopeutta.

Jäädytystä -80 asteessa eli passiivista jäädytystä voidaan käyttää myös referenssi- ja validointimenetelmänä jäädytyslaitteelle, jos epäilee, että laboratorion jäädytyslaitteessa on vikaa tai ohjelma ei ole toimiva. -80 asteessa afereesituote tai testiputki jäätyy tasaisesti, noin 1 aste minuutissa. Vaikka passiivisesta jäädytysmenetelmästä ei saada jäädytysdokumenttia eikä jäädytysprosessia pysty seuraamaan niin tarkasti kuin ohjelmoitavalla laitteella tehtävää jäädytystä, on sen edullisuus kuitenkin suuri etu. (Morgenstern ym. 2016, 949; Rounioja 2020.)

Siirteen laatuun vaikuttaakin moni eri tekijä. Jäädytysohjelma on yksi, mutta lisäksi myös jäädytysliuos vaikuttaa. Eri Kantasolulaboratorioiden välillä käytetään eri DMSO pitoisuutta. Fimlab Laboratoriot Oy:ssa käytetään 10% pitoisuutta, samoin kuin esimerkiksi Yangin, Pidgornan, Loutfyn ja Shuenin (2014) tutkimuksessa Kanadassa. Donmez ym. (2014) käyttivät tutkimuksessaan 7,5% ja Detry ym. (2014) 6% DMSO pitoisuutta. Abbruzzesen ym. (2009) ja Berensin ym. (2016) tutkimuksissa käytettiin vain 5% pitoisuutta, joten toisena tutkimusaiheena voisi tutkia DMSO pitoisuuden vaikutusta kantasolusiirteen laatuun.

LÄHTEET

Abbruzzese, L., Michieli, M., Rupolo, M., Tassan Toffola, R., Da Ponte, A., Rossi, F.M., Lorenzon, D., Simonelli, C., Gattei, V., De Marco, L. & Mazzucato, M. 2009. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophilengraftment: a single institution experience. *Julkaisussa Vox Sanguinis* 98/2010.

A Sanofi Company. 2013. Mozobil (Plerixafor injection). Patient & Caregiver Education Booklet. Luettu 20.4.2020. <https://www.mozobil.com/-/media/EMS/Conditions/Oncology/Brands/Mozobil/Consumer/pdf/Patient-Education-Booklet.pdf?la=en>

Avecilla, S.T., Goss, C., Marionneaux, S.M., Wright, D.R., Leiva, T.D., Tonon, J., Smith, K.M. & MaslaK, P. 2018. Method comparison study of peripheral blood CD34+ count performed on an Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer versus flow cytometry reference procedure (modified ISHAGE). *Julkaisussa HHS Public Access, Author manuscript. Adv Cell Gene Ther* 1.9.2018, 1-13.

Babic, A. & Trigoso, E. 2017. Cell Source and Apheresis. Teoksessa Kenyon, M. & Babic, A. (toim.) *The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses: Under the Auspices of EBMT*. Luku 5. (E-kirja). Sveitsi: Springer.

Beckman Coulter Life Science. 2017. Navios Flow Cytometer.

Berens, C., Heine, A., Müller, J., Held, S., Mayer, K., Brossart, P., Oldenburg, J., Pötzsch, B., Wolf, D. & Rühl, H. 2016. Variable resistance to freezing and thawing of CD34-positive stem cells and lymphocyte subpopulations in leukapheresis products. *Julkaisussa Cytotherapy* 18/2016.

BiteSizeBio. 2013. Cell Counting with a Hemocytometer. Julkaistu 3.6.2013. Päivitetty 8.12.2014. Luettu 22.1.2020. <https://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>

CaridianBCT. 2011. Spectra Optia-afereesijärjestelmä. Mononukleaarisolujen (MNC) keräystoimenpiteen opas. 6/2011.

Decot, V., Alla, F., Latger-Cannard, V., Visanica, S., Witz, B., Stoltz, J-F. & Bensoussan, D. 2012. Thawed autologous peripheral blood stem cells require modified quantification methods for hematopoietic progenitor cell evaluation. *Julkaisussa Bio-Medical Materials and Engineering* 22/2012, 57–67.

Detry, G., Calvet, L., Straetmans, N., Cabrespine, A., Ravoet, C., Bay, J.O., Petre, H., Paillard, C, Husson, B., Merlin, E., Boon-Falleur, L., Tournilhac, O., Delannoy, A. & Halle, P. 2014. Impact of uncontrolled freezing and long-term storage of peripheral blood stem cells at –80 °C on haematopoietic recovery after autologous transplantation. Report from two centres. *Julkaisussa Bone Marrow Transplantation* 31/2014.

Donmez, A., Yilmaz, F., Soyer, N., Cagiran, S., Arik, B., Tombuloglu, M. 2014. The loss of CD34+ cells in peripheral hematopoietic stem cell products cryo-preserved by non-controlled rate freezing and stored at -80 °C after overnight storage. Turkki: De- partment of Hematology, Ege University Medical School. Julkaisussa: Transfusion and Apheresis Science 51/2014.

El-Ghariani, K. & Szczepiorkowski, Z. W. 2017. Stem Cell Collection and Therapeutic Apheresis. Teoksessa Murphy, M.F., Roberts, D.J. & Zazer, M.H. (toim.) Practical Transfusion Medicine. Osa 6. Cellular and Tissue Therapy and Organ Transplantation. 4. uudistettu painos. Singapore: Wiley Blackwell. 442-454.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2018. Fimlab Laboratoriot Oy. Luettu 13.10.2018. www.fimlab.fi

Golubeva, V., Mikhalevich, J., Novikova, J., Tupizina, O., Trofimova, S. & Zueva, Y. 2014. Novel cell population data from a haematology analyzer can predict timing and efficiency of stem cell transplantation. Julkaisussa Transfusion and Apheresis Science 50/2014, 39-45.

Haein, Y., Jaeun, Y., Jung, S.H., Mikyung, K., Kyung, H.B., Dong, W.J., Jong, H., Ji, Y.L., Sunmi, H., Chanil, C., Myungshin, K. & Yonggoo, K. 2019. Enumeration of CD34-positive Stem Cells Using the ADAMI Image-based Fluorescence Cell Counter. Julkaisussa Transfusion Medicine. Annals Of Laboratoru Medicine 39/2019, 388-395.

Hatton, C., Hay, D., Hughes-Jones, N. & Keeling, D. 2017. Haematology Lecture Notes. 10. painos. Malesia: Wiley-Blackwell.

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. painos. Helsinki: Edita.

Hoffbrand, A. & Moss, P. 2011. Essential Haematology. 6. painos. Singapore: Fabulous Printers Pte Ltd.

Howard, M. & Hamilton, P. 2013. Haematology an Illustrated Colour Text. 4. painos. Kiina: Churchill Livingstone Elsevier.

Itälä-Remes, M. & Volin, L. 2015. Kantasolujen siirto (luuytimensiirto). Teoksessa Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E.-R. (toim.) Veritaudit. Osa 5. Hematopoieettisten kantasolujen siirrot. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 450-479.

Jantunen, E., Kuittinen T., Mahlamäki, E. & Nousiainen, T. 2001. Autologiset kantasolusiirrot non-Hodgkin-lymfoomissa. Duodecim 2001;117. 1151-1157.

Kananen, J. 2011. Kvantti. Kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu

Knight, G. 2010. An introduction to haematological malignancies. Teoksessa Moore, G., Knight, R. & Blann, A. (toim.) Haematology. Osa 3. haematological Malignancies. New York: Oxford University Press

Lab Test Online. 2020. Flow Cytometry. Luettu 18.2.2020. <https://lab-testsonline.org/flow-cytometry>

Laki potilaan asemasta ja oikeuksista 17.8.1992/785.

Luiro, S. 2016. Kantasolusiirtotoiminnan laatujärjestelmän yleiskuvaus. Laboratorio-ohje. Laadittu 09.5.2016. Hyväksytty 29.9.2016. Käyttöönottopäivä 29.9.2016. Luettu 16.10.2018.

McCullough, J. 2017. Transfusion Medicine. 4 painos. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Incorporated.

Mian, H., Foley, R. & O'Hoski, P. 2017. Haemopoietic Stem Cell Processing and Storage. Teoksessa Murphy, M.F., Roberts, D.J. & Zazer, M.H. (toim.) Practical Transfusion Medicine. Osa 6. Cellular and Tissue Therapy and Organ Transplantation. 4. uudistettu painos. Singapore: Wiley Blackwell. 455-465.

Morgenstern, D. A., Ahsan, G., Brocklesby, M., Ings, S., Balsa, C., Veys, P., Brock, P., Anderson, J., Amrolia, P., Goulden, N., Cale, C.M. & Watts, M.J. 2016. Post-thaw viability of cryopreserved peripheral blood stem cells (PBSC) does not guarantee functional activity: important implications for quality assurance of stem cell transplant programmes. Julkaisussa British Journal of Haematology. 942-951.

Murugesan, M., Nair, C.K., Nayanar, S.K. & Pentapati, K.C. 2019. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells: A comparison between single- versus dual-platform methodology using the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering protocol. Julkaisussa Asian Journal of Transfusion Science. 13(1)/2019, 43-46.

Namdaroğlu, S., Tekgunduz, E., Bozdağ, S.C., Durgun, G., Sarıca, A., Demiriz, I.S., Kocubaba, S., Iskender G., Kayıkçı, O. & Altuntas F. 2013. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products. Julkaisussa Transfusion and Apheresis Science 48/2013, 403–406.

Passweg, J.R., Baldomero, H., Bader, P., Bonini, C., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R.F., Dufour, C., Kuball, J., Farge-Bancel, D., Gennery, A., Kröger, N., Lanza, F., Nagler, A., Sureda, A. and Mohty, M. 2014. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. Julkaisussa Blood Marrow Transplantation 51/2016, 786-792.

Pirkanmaan sairaanhoitopiirin kuntayhtymä. 2020. Tays kantasolusiirtotoiminnan laatukatselmus vuotta 2019 koskien. Muistio 16.4.2020. Luettu 20.4.2020.

Porkka, K. 2004. Kantasolujensiirrot. Duodecimlehti. 11/2004. 1391-1399.

Preti, R.A., Chan, W.S., Kurtzberg, J., Dornsife, R.E., Wallace, P.K., Furlage, R., Lin, A., Omana-Zapata, I., Bonig, H. & Tonn, T. 2014. Multi-site evaluation of the BD Stem Cell Enumeration Kit for CD34+ cell enumeration on the BD FACS-Canto II and BD FACSCalibur flow cytometers. Julkaisussa Cytotherapy 16/2014, 1558-1574.

Raval, J.S., McKay, K. & Park, Y.A. 2017. Hematopoietic cell processing: From Procurement to infusion. Teoksessa Abutalib, S.A. & Hari, P. (toim.) Clinical Manual of Blood and Bone Marrow Transplantation. Singapore: Wiley Blackwell, 59-65.

Rico, L.G., Junca, J., Ward, M.D., Bradford, J. & Petriz, J. 2018. Yellow–Green Laser-Based Flow Cytometry for CD34+ Progenitor Cell Counting. Julkaisussa Cytometry Part A 93A/2018, 172-176.

Rontu, R. 2018. Erikoisnäyte Sysmex XN-1000 laitteella. Laboratorio-ohje. Laadittu 9.9.2018. Hyväksytty 17.9.2018. Käyttöönottopäivä 13.9.2018. Tulostettu 15.1.2019.

Rounioja, S. 2016. CD34-positiiviset kantasolut Navios-virtaussytometrillä. Laboratorio-ohje. Laadittu 22.12.2016. Hyväksytty 22.12.2016. Käyttöönottopäivä 23.12.2016. Tulostettu 15.1.2019.

Rounioja, S. Laboratoriohematologian erikoislääkäri. 2020. Jäädätyksen vaikutus autologisiin kantasoluihin, tuloksista. Sähköpostiviesti. Luettu 27.4.2020.

Ruutu, T. 2007. Kantasolujen siirrot veritautien hoidossa. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 492–503.

Shu, Z., Heimfeld, S. & Gao, D. 2014. Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Cryo-pre- served Grafts: Adverse Reactions after Transplantation and Cryoprotectant Removal Prior to Infusion. Julkaisussa Bone Marrow Transplantation 49(4) /2014, 469–476.

Siitonen, T. & Koistinen, P. 2015. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Teoksessa Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E.-R. (toim.) Veritaudit. Osa 1. Johdatus hematologiaan. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 16-30.

Siitonen, S. & Penttilä, T.-L. 2015. Pahanlaatuisten veritautien immunofenotyyppitys. Teoksessa Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E.-R. (toim.) Veritaudit. Osa 2. Hematologiset laboratoriotutkimukset. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 16-30.

Siro, P. 2017a. Kantasoluviljely. Työohje. Fimlab Laboratoriot Oy. Laadittu 20.2.2017. Hyväksytty 23.2.2017. Käyttöönottopäivä 20.2.2017. Luettu 30.1.2019.

Siro, P. 2017b. Planer Biomed Kryo-jäädätyslaite. Työohje. Fimlab Laboratoriot Oy. Laadittu 10.10.2017. Hyväksytty 11.10.2017. Käyttöönottopäivä 11.10.2017. Luettu 17.2.2019.

Siro, P. 2017c. Solujen viabiliteetti (Trypan blue exclusion test). Työohje. Laadittu 23.2.2017. Hyväksytty 23.2.2017. Käyttöönottopäivä 23.2.2017. Luettu 30.1.2019.

Siro, P. 2018. Kantasolusiirto. Työohje. Fimlab Laboratoriot Oy. Laadittu 5.12.2018. Hyväksytty 24.7.2019. Käyttöönottopäivä 24.7.2019.

Siro, P. 2019. Kantasolutuotteen käsittely, pakastus ja säilytys. Työohje. Fimlab Laboratoriot Oy. Laadittu 13.11.2019. Hyväksytty 13.11.2019. Käyttöönottopäivä 13.11.2019. Luettu 17.2.2019.

Stem Cell Technologies. 2011. The World Leader in Tool For Hematopoietic Stem Cell Research. Hemapoeietic Stem cell Products. Gatalog. Versio 3.0.0.

Suárez-Álvarez, B., López-Vázquez, A. & López-Larrea, C. 2012. Stem Cell Transplantation. Yhdysvallat: Landes Bioscience, Springer.

Sunilkumar, K. & Preeta, N. 2016. Usefulness of automated hematology analyzer Sysmex XN 1000 in detection of Malaria. Julkaisussa Indian Journal of Pathology and Oncology 3(4)/2016, 658-661.

Sutherland, D. R., Nayyar, R., Acton, E., Giftakis, A., Dean, S. & Mosiman, V.L. 2009. Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers. Julkaisussa Cytotherapy 11/2009, 595-605.

Sysmex. 2020. Fluorescence Flow Cytometry. Luettu 5.2.2020. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>

Terumo BCT. 2019 Spectra Optia Apheresis System. Luettu 4.2.2020. <https://www.terumobct.com/spectra-optia>

Tiwari, A.K., Pandey, P., Subbaraman, H., Bhargava, R., Rawat, G., Madiraju, S., Raina, V. & Bhargava R. 2016. Autologous peripheral blood stem cell harvest: Collection efficiency and factors affecting it. Julkaisussa Transfusion Science 10/2016. 93-97.

Uusirasi, T. 2020. Virtausytometrian vastuuhoitaja. Henkilökohtainen tiedonanto, keskustelu 6.4.2020.

Varan, H. D., Bay, M., Ozturk, A., Dalvac, K. & Ilhan, O. 2019. Comparison of the methods evaluating post thawing viability of peripheral T blood stem cell graft. Julkaisussa Transfusion and Apheresis Science 58/2019, 192-195.

Varmavuo, V. 2013. Plerixafor in Autologous Stem Cell Transplantation. Julkaisussa Publications of the University of Eastern Finland Dissertations in Health Sciences Number 195, 1-91.

Vilpo, J. 2010. Hematopoieesi. Teoksessa Vilpo, J. (toim.) Ilmari Palvan veritauti. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy. 15-20.

Välimäki, M. 2015. Potilasta ja hoitotyötä koskevat eettiset lähtökohdat. Teoksessa Leino-Kilpi, H. & Välimäki, M. Etiikka Hoitotyössä. Osa 1. Mitä etiikka on? 8.-10. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy. 137-159.

Walters, R. 2013. Haemopoietic Stem Cell Banking. Teoksessa Knight, R. (toim.) Transfusion & Transplantation Science. Oxford: Oxford University Press. 217-235.

Yang, H., Pidgorna, A., Loutfy, M.R. & Shuen, P. 2014. Effects of interruptions of controlled-rate freezing on the viability of umbilical cord blood stem cells. *Julkai-sussa Transfusion* 1/2015.

LIITTEET

Liite 1. Kantasolukeräyksen koontilomake

Fimlab
KANTASOLULABORATORIO

KOONTILOMAKE
KANTASOLUKERÄYS VERSIO 2013

ESTIEDOT
Nimi POTILAS 7
Sotu 7
Mobiiliasio hoido MATILY + Pivertifor pvm 31.11.2018

KER. JÄRJ. NRO 2599

Os. Neutrolymfooma
dg Neutrolymfooma
pato 93,3 kg

VERIARVOT KERÄYSPÄIVÄN AAMUNA
B-leik 14,1 x10E9/l Hct 0,35 B-tromb 55 x10E9/l
CD34 0,46 % CD34 63,00 x10E6/l

KERÄYS
Paino 6,12.2018 / 9.03 - 13.21 oheisma Optima / HCT3m / 12.10.2018
Vastanottaja 067 Kilo 17,10 tilavuus Opetista 266 ml

Puutettu tilavuus 271 ml leik 208,4 x10E9/l (pussi + coupler 311g)
TNC 564,8 x10E8 TNC/kg 64 x10E8/kg
MNC 266,6 x10E8 MNC/kg 30 x10E8/kg MNC 472 %
CD34 374 x10E6 CD34/kg 42 x10E6/kg CD34 0,69 %

KÄSITTELY
Säilytys + 4°C yön yli ☒
Plasmaa lisätty 50 ml tekija AMN
4% alb lisätty ml tekija AMN
vielo seuraavana päivänä 93 % tekija AMN
pvm 12.12.2016 vast. lääkäri AMN

Fimlab
KANTASOLULABORATORIO

KOONTILOMAKE
KANTASOLUKERÄYS VERSIO 2013

Nimi POTILAS 7
Sotu 7
JÄÄDYTYS pvm 7.12.2018
Hepar. lisätty 3500 U lot 5001467
Soluja 271 ml
DMSO 35 ml lot US86F15
4% ALB 44 ml lot US86F15
yht. 350 ml lot US86F15
SÄILYTYS säiliämpötila -196° C
Sijainti 82A(1), B(2), C(3), D(4), E(5)
testipaketit 4 kpl sijainti 608
Muuta huomioitavaa AMN

KANTASOLUJÄÄTTEEN PALAUTUSKELPOISUUS
Kantasolujäätteä 1/4, 7 x 10⁶ pes / kg sulatusta näytteestä
Bakt. värjätys neg ☒ pos ☐ bakt. värjätys neg ☒ pos ☐
Bakt. viljely neg ☒ pos ☐ bakt. viljely neg ☒ pos ☐
Poikkeamaraportti tehnyt/pv ☐ ei tehty ☐

Kantasoluliite on palautuskelpoinen 2012.2016 pvm AMN

SOLUJEN PALAUTUS
1. siirto pvm/nro 30.12.2019 / 1051 tekija AMN
Annettu pusit 88a, b, c, d, e
2. siirto pvm/nro AMN tekija AMN
Annettu pusit AMN tekija AMN

Liite 2. Virtausytometrian esimerkkituloste

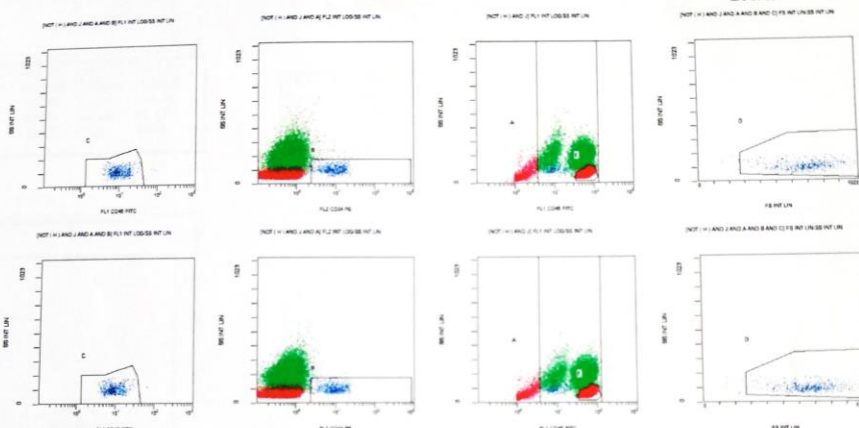
Navios Panel Report: 8535

Fimlab Laboratoriot
Biokatu 4
Tampere

1/13/2020 10:23 AM Runtime Results

Sample ID1: Potilas 9 Name: Potilas 9
Panel Name: Stem Cells Patient ID: D.O.B.:

Panel Complete: Y Match: Y Navios SN: AS29159
LMD FileNames(s): Navios v 1.3:
C:\Beckman Coulter User Data\Users\CD34\LMD\Potilas 9 13.1.2020 00045601 001.LMD
C:\Beckman Coulter User Data\Users\CD34\LMD\Potilas 9 13.1.2020 00045603 003.LMD
Collection Date: 13Jan2020 12:00 AM User ID: CD34
Analysis Date / Time: 13Jan2020 10:23 AM Tube ID: NoRead
Sex: ID#: Hematology Date / Time:
Physician: Sulatettu Hematology Instrument:
Sample Type: Apheresis WBC: $8.13 \times 10^3/\mu\text{L}$ LY%:
Dilution Factor: 10.00 RBC: MO%:
Harvest Volume: 131.00 mL PLT: NE%:
Body Weight: 75.60 kg BA%:



Description:	Region	Result	Cells/uL CAL	Opt Stat 1	Opt Stat 2
CD34 pos soluja 10E6/L	eq	500.00			
CD34 pos soluja %	eq	1.58			
CD34 pos soluja kerayksessa 10E6	eq	65.50			
CD34 pos soluja 10E6/kg	eq	0.87			
CD34 pos soluja 10E6/L	eq	500.00			
CD34 pos soluja %	eq	1.63			
CD34 pos soluja kerayksessa 10E6	eq	65.50			
CD34 pos soluja 10E6/kg	eq	0.87			
R: CD34 1E6/L (putki1/putki2)	eq	1.00			
KA: CD45 pos soluja 10E9/L	eq	31.11			
KA: CD34 pos soluja 10E6/L	eq	500.00			
KA: CD34 pos soluja %	eq	1.61			
KA: CD34 pos soluja kerays 10E6	eq	65.50			
KA: CD34 pos soluja 10E6/kg	eq	0.87			

Page 1 of 1

Signature: 69

Liite 3. Autologinen kantasolusiirto vaiheittain

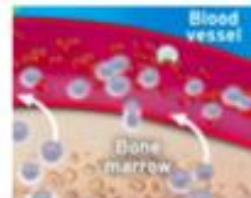
1. INJEKTIOT

Mobilisaatiota varten, esim. kasvutekijä (G-CSF)



2. MOBILISAATIO

Kantasolut siirtyvät luuytimeistä verenkiertoon



3. KANTASOLUKERÄYS

Kantasolut kerätään verenkierrosta afereesilaitteen avulla infuusiopussiin



4. KÄSITTELY

Kantasolut käsitellään laboratoriossa jäädytystä varten



5. JÄÄDYTYS JA SÄILYTYS

Kantasolut jäädytetään ja säilytetään nestetyyppisammiossa



6. SOLUNSALPAAJA-/SÄDEHOITO

Hoitojen tarkoituksena on tuhota jäljellä olevat syöpäsolut



7. KANTASOLUSIIIRTO

Kantasolut sulatetaan ja palautetaan verenkiertoon.



(A Sanofi Company 2013, muokattu)